

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Mirna Merkler

UTJECAJ PERINATALNE PROMJENE METABOLIZMA  
SEROTONINA NA RAZVOJ I PONAŠANJE MLADUNACA  
ŠTAKORA

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja Magistra eksperimentalne biologije.

## **ZAHVALA**

---

*Od srca zahvaljujem svima koji su pridonijeli izradi ovog diplomskog rada.*

*Posebno zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na pruženoj prilici za rad u području neurofiziologije, na stručnom vodstvu, razumijevanju i svoj pomoći te savjetima prilikom izrade ovog rada.*

*Također zahvaljujem dr. sc. Sofiji Ani Blažević na strpljenju i neizmjernoj pomoći oko literature i analize ultrazvučnog glasanja te na posebno ugodnom druženju tijekom rada.*

*Zahvaljujem na pomoći i mr. sc. Danijeli Hamidović sa Državnog zavoda za zaštitu prirode.*

*Veliko hvala majci Jadranki i sestri Ani te ostatku obitelji i prijateljima na podršci tijekom cijelog studija.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **UTJECAJ PERINATALNE PROMJENE METABOLIZMA SEROTONINA NA RAZVOJ I PONAŠANJE MLADUNACA ŠTAKORA**

Mirna Merkler

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

### **SAŽETAK**

Serotonin (5HT) je biogeni amin prisutan u mozgu (središnji odjeljak) i tjelesnim tkivima (periferni odjeljak) gdje ima različite fiziološke uloge. U ovom radu ispitali smo utjecaj perinatalnog povećanja koncentracije serotonina na stopu preživljenja, prirast tjelesne mase i anksiozno ponašanje mladunaca štakora. Životinje smo tretirali od 13. gestacijskog do 21. postnatalnog dana prekursorom serotonina, 5-hidroksitriptofanom (5-HTP) ili inhibitorom razgradnje serotonina, tranilciprominom (TCP). Kontrolnu skupinu tretirali smo fiziološkom otopinom. Obje eksperimentalne skupine su imale znatno smanjenu stopu preživljenja, dok su preživjeli mladunci imali značajno manju masu, kao i njezin prirast, u odnosu na kontrolnu skupinu. Anksiozno ponašanje pratili smo testom ultrazvučnog dozivanja nakon izdvajanja iz legla 13., 16. i 18. postnatalnog dana. Životinje tretirane TCP-om imale su značajno kraće vrijeme latencije do prvog doziva, te znatno veći ukupni broj doziva, broj sljedova doziva i trajanje doziva. U životinja tretiranih 5HTP-om ove su vrijednosti bile slične kontrolnima. U obje eksperimentalne skupine došlo je do kasnijeg prebacivanja frekvencije ultrazvučnog dozivanja s infantilne (40 kHz) na juvenilnu (50 kHz). Rezultati upućuju na to da povišena koncentracija serotonina u doba perinatalnog razvoja negativno djeluje na razvoj mladunaca, povećava razinu anksioznosti i odgađa sazrijevanje mladunaca. Pri tome je učinak TCP-a, koji povišuje koncentraciju 5HT u oba odjeljka, drastičniji od učinka 5-HTP-a koji povišuje koncentraciju 5HT samo u perifernom odjeljku.

(38 stranica, 22 slike, 1 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: serotonin, 5-hidroksitriptofan, tranilcipromin, anksioznost, ultrazvučno dozivanje

Voditelj: dr.sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.

Ocjenitelji: dr.sc. Dubravka Hranilović, izv. prof., dr.sc. Biljana Balen, izv. prof., dr.sc. Silvija Černi, doc.

Rad prihvaćen: 05. 02. 2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### **EFFECT OF PERINATAL CHANGES IN SEROTONIN METABOLISM ON THE DEVELOPMENT AND BEHAVIOUR OF RAT PUPS**

Mirna Merkler

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

### **SAŽETAK**

Serotonin (5HT) is a biogenic amine present both in the brain (central compartment) and in peripheral tissues (peripheral compartment) where it has different physiological functions. In this thesis we have studied the influence of perinatal increase in serotonin concentrations on survival rate, weight gain and anxiety-like behavior in rat pups. The animals were treated with serotonin precursor 5-hydroxytryptophan (5-HTP) or with serotonin catabolism inhibitor tranylcypromine (TCP) from gestational day 13 to post-natal day 21. Control group was treated with saline. Both experimental groups had significantly lower survival rates, while the survived pups had significantly lower body mass and weight gain compared to the control group. Anxiety-like behavior was determined by analyzing ultrasonic vocalization after separation from litter on post-natal days 13, 16 and 18. TCP-treated animals had significantly reduced latency to the first call and significantly higher number of calls, number of call sequences and duration of calls. In animals treated with 5HTP, these values were similar to those of the control group. A delay in frequency transition from infantile (40 kHz) to juvenile (50 kHz) was observed in both experimental groups. The results suggest that exposure to increased serotonin concentrations during perinatal period negatively affects rat development, increases the level of anxiety and delays maturation. The effect of TCP, which raises serotonin level in both 5HT compartments, is more drastic than the effect of 5HTP, which raises serotonin concentration only in the peripheral compartment.

(38 pages, 22 figures, 1 table, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: serotonin, 5-hydroxytryptophan, tranylcypromine, anxiety, ultrasonic vocalization

Supervisor: dr.sc. Dubravka Hranilović, Associate Professor

Reviewers: dr.sc. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof., dr.sc. Biljana Balen, Assoc. Prof., dr.sc. Silvija Černi, Asst. Prof.

Thesis accepted: 05. 02. 2015.

# SADRŽAJ

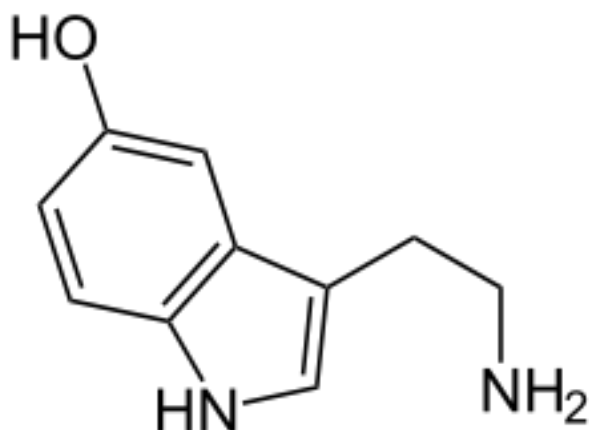
1. UVOD.....	1
1.1. SEROTONIN.....	1
1.1.1. Rasprostranjenost i funkcije serotonina .....	1
1.1.2. Metabolizam serotonina.....	3
1.2. SEROTONINSKI ODJELJCI.....	3
1.2.1. Središnji serotoninski sustav .....	3
1.2.2. Periferni serotoninski sustav .....	7
1.2.3. Povezanost centralnog i perifernog serotoninskog sustava.....	7
1.3. SEROTONIN I PONAŠANJE.....	9
1.3.1. Fiziološka uloga serotonina .....	9
1.3.1.1. Ultrazvučno dozivanje.....	9
1.3.2. Povezanost serotonina sa poremećajima ponašanja .....	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Životinje.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Pribor.....	14
3.2. METODE.....	15

3.2.1.	Provjera kopulacije .....	15
3.2.2.	Injiciranje .....	15
3.2.3.	Preživljenje i prirast tjelesne mase mladunaca.....	15
3.2.4.	Ultrazvučno dozivanje .....	16
3.2.5.	Statistička analiza.....	16
4.	REZULTATI .....	17
4.1.	PREŽIVLJENJE MLADUNACA .....	17
4.2.	PRIRAST TJELESNE MASE .....	18
4.3.	ULTRAZVUČNO DOZIVANJE .....	19
4.3.1.	Vrijeme latencije.....	21
4.3.2.	Broj doziva.....	22
4.3.3.	Broj sljedova .....	23
4.3.4.	Trajanje doziva.....	24
4.3.5.	Frekvencija maksimalne energije dozivanja .....	25
5.	RASPRAVA .....	28
5.1.	TRETMAN 5HTP-om i TCP-om .....	28
5.2.	PERIFERNI UČINCI TRETMANA .....	29
5.3.	SREDIŠNJI UČINCI TRETMANA .....	30
6.	ZAKLJUČAK.....	32
7.	LITERATURA .....	33
8.	ŽIVOTOPIS.....	37

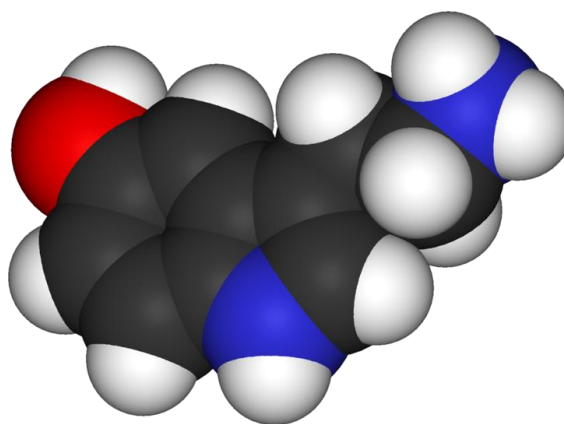
## 1. UVOD

### 1.1. SEROTONIN

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biološki aktivan indolamin (3-(2-aminoetil)-5-hidroksiindol) prisutan u mozgu i perifernim tkivima (slike 1 i 2). Pripada skupini monoaminskih neurotransmitera i neuromodulatora zajedno sa dopaminom, adrenalinom i noradrenalinom. Nastaje iz esencijalne aminokiseline L-triptofana metaboličkim putem koji koristi dva enzima: triptofan hidroksilazu (TPH) i dekarboksilazu aromatičnih aminokiselina (Mohammad-Zadeh et al., 2007). Maurice Rapport i sur. su 1948. godine prvi puta izolirali serotonin iz krvnog seruma i uočili da ovaj spoj povećava tonus krvnih žila. Zbog ovih vazokonstriktorskih svojstava serotonin je dobio ime (Sirek A. i Sirek O.V., 1970).



Slika 1. Strukturna formula serotonina  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin\\_syndrome](http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin_syndrome))



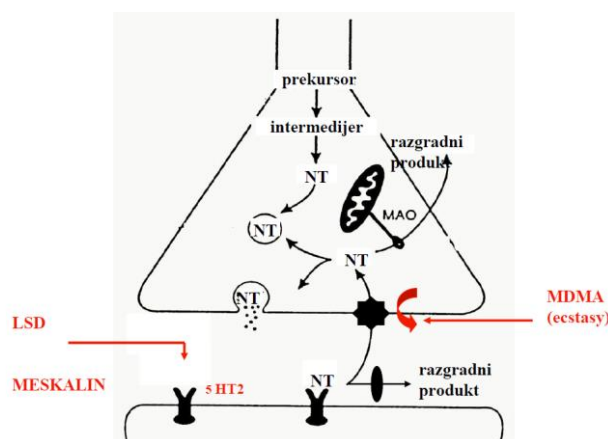
Slika 2. Trodimenzionalni prikaz serotonina  
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin>)

#### 1.1.1. Rasprostranjenost i funkcije serotonina

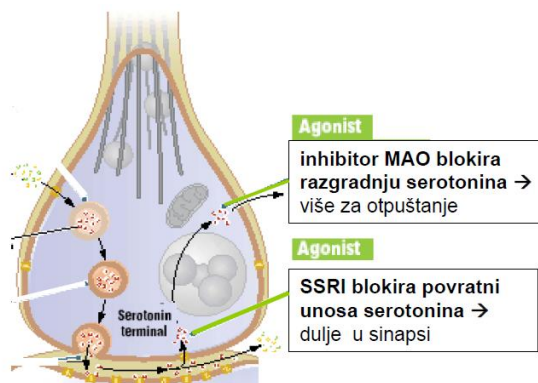
Serotonin je široko rasprostranjen u namirnicama kao što su mlijeko, sir, voće, vino ili čokolada (Sirek A. i Sirek O.V., 1970). Neke psihoaktivne supstance povećavaju količinu serotonina u organizmu što izaziva osjećaj euforije i ovisnost (npr. meskalin, MDMA, LSD) (slika 3). Također, određeni lijekovi mijenjaju razine serotonina u organizmu, te se iz tog razloga koriste u liječenju depresije, anksioznog poremećaja i socijalne fobije. Te lijekove s obzirom na njihov put



djelovanja možemo podijeliti na neselektivne inhibitore monoaminooksidaze (MAOI), neselektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina (tricikličke antidepresive) i selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina (engl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*, SSRI). Inhibitori monoaminooksidaze (MAOI) blokiraju enzim monoaminooksidazu čime sprječavaju razgradnju svih monoaminskih neurotransmitera. U skupinu monoaminskih neurotransmitera pripada i serotonin, te na taj način MAOI uzrokuju porast koncentracije serotonina u mozgu. Neselektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (triciklički antidepresivi) inhibiraju povratni unos serotonina, dopamina i noradrenalina, zbog čega ovi spojevi ostaju dulje vrijeme u sinapsi. Najnovija skupina lijekova, SSRI, dizajnirani su kako bi djelovali isključivo na serotonininski sustav. Ovi antidepresivi inhibiraju povratni unos serotonina iz sinapse, dok na druge neurotransmitere imaju minimalni ili nikakav učinak (slika 4) (National Collaborating Centre for Mental Health (UK), 2010).



Slika 3. Mehanizam djelovanja psihoaktivnih supstanci



Slika 4. Mehanizam djelovanja antidepresiva (prema Kolb et al., 2011)

U tijelu sisavaca serotonin regulira brojne fiziološke funkcije poput raspoloženja, apetita, tjelesne težine, ciklusa budnosti i spavanja, motorike, termoregulacije i spolne aktivnosti. Serotonin ima utjecaj i na brojne kognitivne funkcije poput ponašanja, učenja i pamćenja (Sirek A. i Sirek O.V., 1970). Tijekom embriogeneze serotonin utječe na neuralni i kraniofacijalni razvoj, te regulira brojne razvojne procese poput proliferacije, migracije i diferencijacije stanica, te programirane stanične smrti (Azmitia, 2001).

#### 1.1.2. Metabolizam serotonina

Sinteza serotonina odvija se u serotonergičnim neuronima u jezgrama rafe moždanog debla i enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva. Hidroksilacijom esencijalne aminokiseline L-triptofana uz pomoć enzima triptofan hidroksilaze (TPH) nastaje 5-hidroksitriptofan (5-HTP), a njegovom dekarboksilacijom serotonin (Racke et al., 1996).

TPH postoji u dvije izoforme, TPH1 koji je rasprostranjen u ne-živčanom tkivu i TPH2 koji je ograničen na živčane stanice. TPH1 se nalazi u placenti, koštanoj srži, enterokromafinim stanicama tankog crijeva, gušterači, kostima i srcu, dok je TPH2 aktivna u embriju, neuronima središnjeg živčanog sustava i mijenteričkim neuronima tankog crijeva (Amireault et al., 2012).

Razgradnja serotonina odvija se u presinaptičkim neuronima te u jetri i plućima. U prvom koraku metabolizma monoaminooksidaza oksidira serotonin do 5-hidroksiindolacetaldehida. Zatim ga aldehyd dehidrogenaza oksidira pri čemu nastaje 5-hidroksiindolactena kiselina (5-HIAA) koja se oslobađa u cerebrospinalni sustav ili izlučuje urinom (Cook i Leventhal, 1996).

### 1.2. SEROTONINSKI ODJELJCI

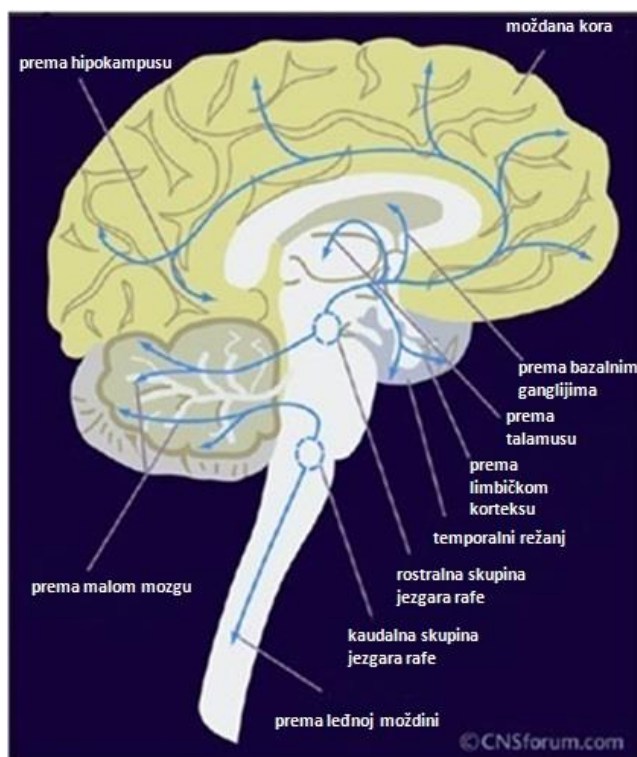
#### 1.2.1. Središnji serotoninski sustav

U mozgu serotonin obavlja funkciju neurotransmitera i kontrolira razvoj 5HT neurona i ciljnih regija tijekom neurogeneze. Rana pojava serotonina u prenatalnom razvoju i mnogobrojni učinci na morfogenezu mozga doveli su do zaključka da serotonin ima ključnu ulogu u organizaciji živčanog sustava sisavaca. U ljudskom mozgu razvoj serotoninskog sustava započinje već u 5. tjednu gestacije. Razine serotonina u mozgu oko druge godine života dosežu svoj maksimum,

nakon čega počinju opadati, pa je tako koncentracija serotonina u odrasle osobe otprilike 50% koncentracije u djece. U štakora razvoj serotoniniskog sustava započinje 12. dan gestacije, a maksimalnu razinu doseže 21. postnatalnog dana (Whitaker-Azmitia et al. 1996).

U mozgu, serotonin proizvode serotonergični neuroni. Tijela ovih neurona su grupirana u devet jezgara rafe (B1 – B9) koje se protežu duž središnje dorzalne linije moždanog debla. S obzirom na njihov položaj, jezgre rafe su podijeljene u dvije skupine: rostralnu skupinu i kaudalnu skupinu. Serotonergični neuroni iz jezgara rafe kaudalne skupine projiciraju svoje aksone prema leđnoj moždini i moždanom deblu, dok oni iz jezgara rafe rostralne skupine projiciraju aksone prema dijelovima kore velikog mozga zaduženih za funkcije poput vida, sluha, njuha i dodira te više funkcije kao što su govor, mišljenje i pamćenje (slika 5) (Mai et al., 2004).

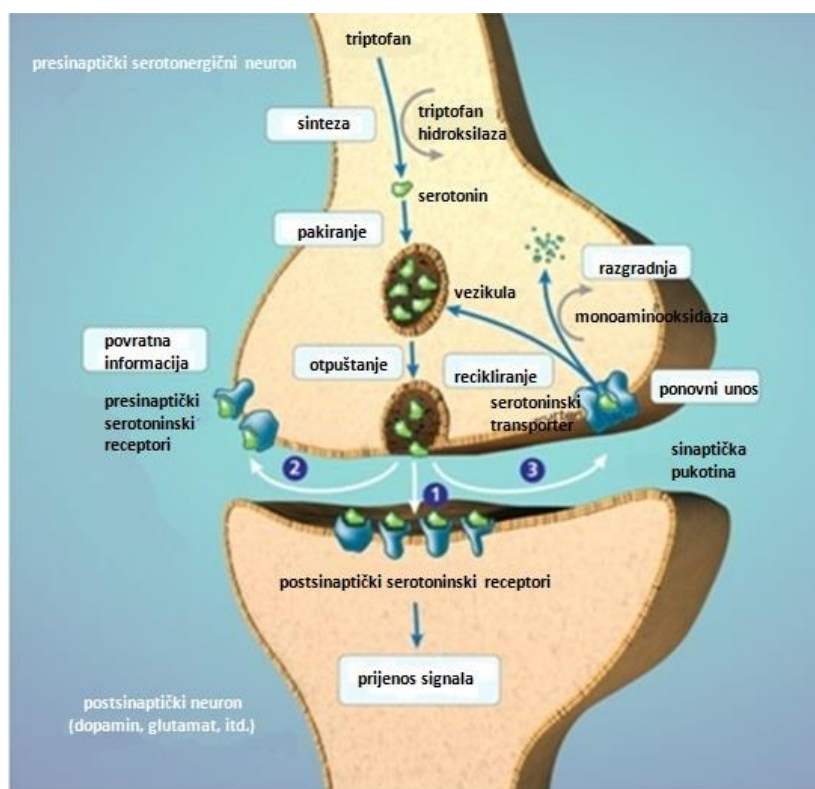
Zahvaljujući toj razgranatoj mreži, serotonin kontrolira brojne bihevioralne i homeostatske procese. Serotonin utječe i na razvoj serotonergičnih neurona negativnom povratnom spregom (Whitaker-Azmitia et al., 1996). Razvoj ovih neurona inhibira se direktnim vezanjem serotonina na neuronski receptor 5-HT<sub>1B</sub>, dok su za stimulaciju rasta odgovorne stanice astroglija izlučivanjem faktora rasta S-100 $\beta$  (Whitaker-Azmitia, 2001).



Slika 5. Projekcije serotonergičnih neurona (prema <https://www.cnsforum.com>)

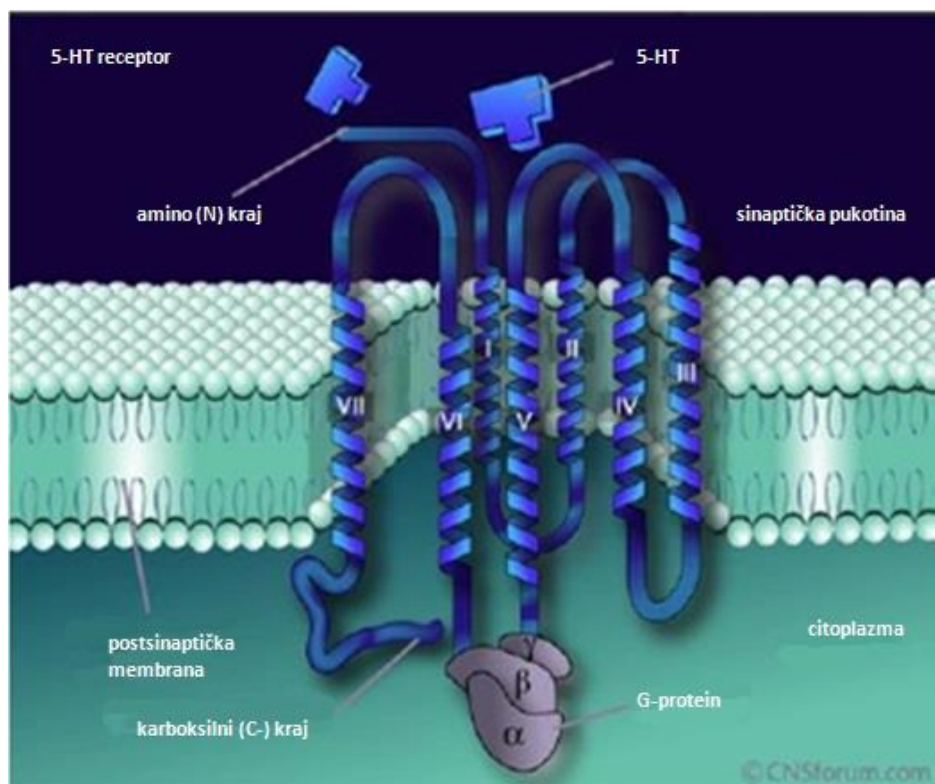
Nakon sinteze u presinaptičkim neuronima, serotonin aktivnim transportom ulazi u vezikule na aksonskim završecima serotonergičnih neurona. U vezikulama se veže za SBP (engl. *serotonin binding protein*). Pojavom akcijskog potencijala dolazi do ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  iona u presinaptički neuron i njihovog vezanja za kalmodulin što potiče egzocitozu vezikula i ispuštanje serotonina u sinaptičku pukotinu (slika 6). Serotonin se zatim veže za odgovarajući receptor što dovodi do aktivacije postsinaptičkog neurona. Ovisno o tipu receptora za koji se vezao, serotonin može izazvati ekscitacijski ili inhibicijski signal. Postoji 7 tipova serotonininskih receptora (5-HT1 – 5-HT7). Gotovo svi receptori su metabotropni sa sedam transmembranskih domena te vezani za G protein (slika 7). Izuzetak su 5-HT3 receptori, koji su ionotropni i tvore kationski kanal (slika 8) (Lesch et al., 1998).

Oslobađanje serotonina se prekida aktivnim transportom natrag u serotonergični, tj. presinaptički neuron preko serotonininskog transportera (5HTt). Broj serotonininskih transportera ovisi o aktivnosti sinapse i nije stalan. U presinaptičkom neuronu serotonin se razgrađuje pomoću monoaminoooksidaze (MAO) ili se reciklira povratkom u vezikule (Melikian, 2004).

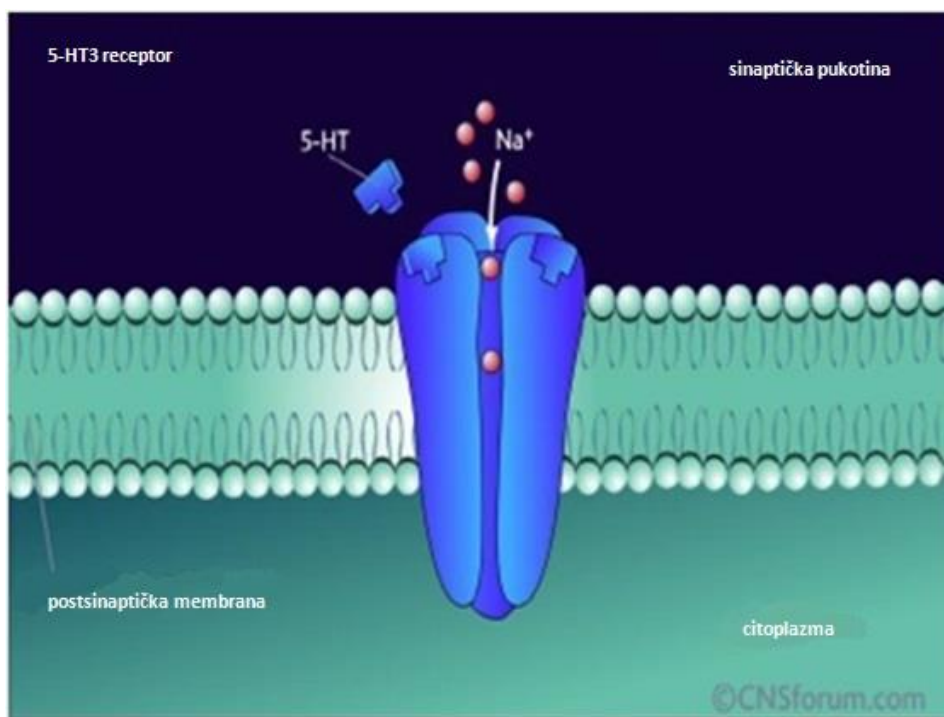


Slika 6. Prijenos serotonina u sinapsi

(prema <http://www.cmaj.ca/content/180/3/305/F1.expansion.html>)



Slika 7. Metabotropni serotonininski receptori (prema <https://www.cnsforum.com>)



Slika 8. Ionotropni (5-HT<sub>3</sub>) serotonininski receptori (prema <https://www.cnsforum.com>)

### 1.2.2. Periferni serotoninski sustav

Serotonin na periferiji sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima, pa tako regulira proliferaciju crijevnih epitelnih stanica, potiče crijevnu peristaltiku, kontrolira lučenje želučane kiseline, stimulira aktivaciju trombocita tijekom zgrušavanja krvi i dr. Najveći dio serotonina u organizmu (čak 95%) sintetizira se na periferiji, točnije u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva. Serotonin se ovdje pohranjuje u sekretorne vezikule iz kojih se otpušta parakrinom sekrecijom u krvotok kao odgovor na mnoge podražaje (Berger et al., 2009).

Trombociti ne mogu sintetizirati serotonin zbog nedostatka enzima TPH, ali posjeduju transporter za njegov aktivni unos. Serotonin potiče aktivaciju trombocita, pojačava interakciju trombocita s tkivnim tromboplastinom (faktorom zgrušavanja krvi) i povećava mogućnost koagulacije. Naime, vezanjem serotonina na serotoninski receptor 5-HT<sub>2</sub>, koji se nalazi na membrani trombocita, dolazi do aktivacije i pojačane agregacije trombocita (Lopez-Vilchez et al., 2009).

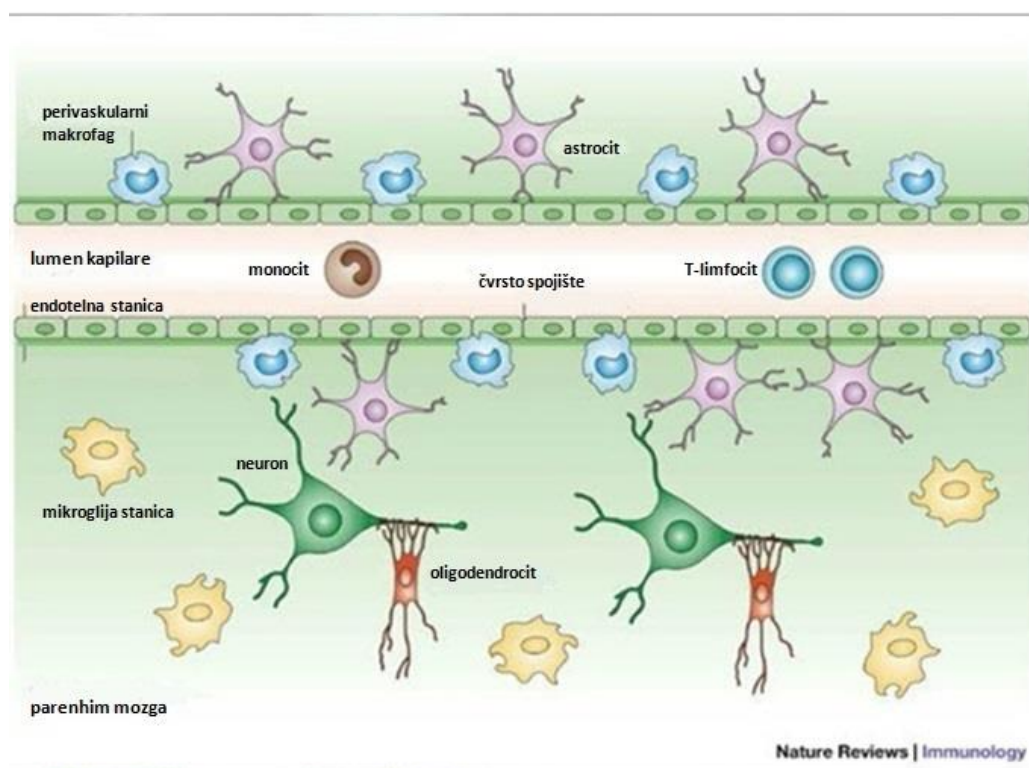
Serotonin ima važnu ulogu i u probavnom sustavu. Kada u organizam unesemo pokvarenu hranu, započinje pojačano lučenje serotonina iz epitelnih stanica koje izaziva dijareju. Međutim, ukoliko se javi velika količina serotonina on stimulira neurone koji šalju signal do centra za povraćanje u moždanom deblu (McManis et al., 1997). Budući da u tankom crijevu postoje obje izoforme TPH, pretpostavlja se da serotonin podrijetlom od TPH1 potiče stvaranje medijatora upale i potiče upalni odgovor kod bolesti gastrointestinalnog sustava, dok serotonin podrijetlom od TPH2 ima ulogu u motilitetu crijeva (Amireault et al., 2012).

### 1.2.3. Povezanost centralnog i perifernog serotoninskog sustava

Krvno-moždana barijera je visoko selektivna propusna barijera koja odvaja mozak od optjecajnog sustava. Zbog specifične složene strukture endotelnih stanica kapilara i astrocita u mozgu, ova barijera sprječava ulazak mnogih neurotransmitera i toksičnih tvari iz krvotoka u mozak. Zahvaljujući tome, javlja se stabilna okolina za rad neurona. Endotelne stanice kapilara spojene su mnogim čvrstim spojištima (engl. *tight junctions*), što onemogućuje paracelularni transport otopljenih tvari iz krvne plazme (slika 9). Budući da je unos i uklanjanje određenih



tvori ipak potreban za normalan rast i funkcioniranje mozga, izmjena tvari između krvi i izvanstanične tekućine mozga posredovana je specifičnim transporterima (Abbott, 2002).



Slika 9. Čvrsta spojišta (prema <http://www.nature.com/nri/index.html>)

Krvno-moždana barijera propušta prekursore serotonina (triptofan i 5-hidroksitriptofan) i metabolite (5-HIAA), ali ne i sam serotonin. Tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razvoja, krvno-moždana barijera nije do kraja razvijena pa centralni i periferni serotoninski odjeljak mogu komunicirati. Ovo razdoblje traje do druge godine života u ljudi i do 20. postnatalnog dana u štakora (Whitaker-Azmitia, 2001). Promjene u metabolizmu serotonina u svakom od odjeljaka mogle bi stoga dovesti do promjena u koncentraciji 5HT i tako narušiti pravilan rast i razvoj serotonergičnih neurona te dovesti do anatomskih i funkcionalnih promjena u mozgu.

### 1.3. SEROTONIN I PONAŠANJE

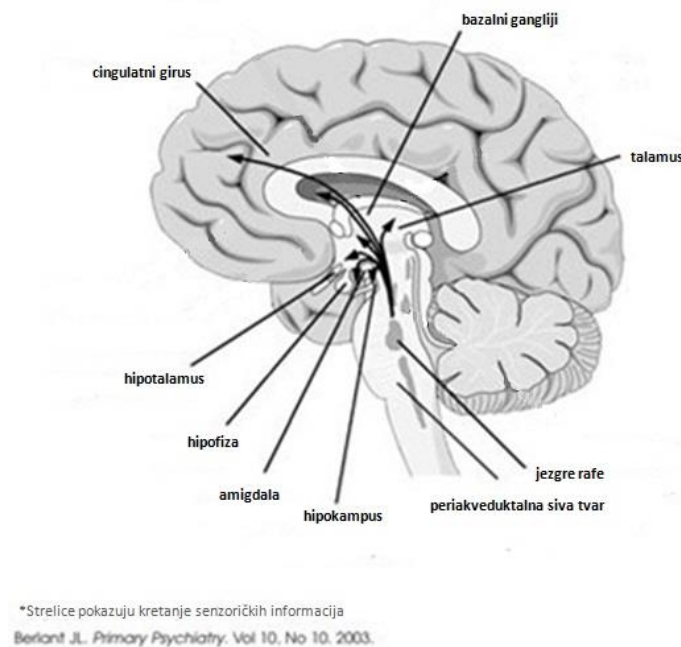
#### 1.3.1. Fiziološka uloga serotonina

Jedna od glavnih teorija fiziološke uloge serotonina u ponašanju predlaže da povećana razina serotonina ograničava aktivaciju ponašanja, dok njegova smanjena razina olakšava aktivaciju odgovora na podražaje iz okoline. Smanjenje razine serotonina dovodi do povećane osjetljivosti na bol, povećanog eksploratornog ponašanja i lokomotorne aktivnosti te povećanog agresivnog i seksualnog ponašanja (Lucki, 1998). S druge strane, stimulacija serotonergične aktivnosti u prednjem mozgu povećava razinu anksioznosti, dok tvari koje smanjuju aktivnost 5HT-neurona djeluju anksiolitički (Kshama et al., 1990; Graeff, 2002).

##### 1.3.1.1. Ultrazvučno dozivanje

Mladunci svih vrsta sisavaca glasaju se prilikom odvajanja od gnijezda, pripadnika iste vrste ili majke. Ovo ponašanje kod mladunaca štakora javlja se zbog gubitka zaštite od predatora i roditeljske brige poput hranjenja i održavanja tjelesne temperature. Visoko frekventno ultrazvučno (UZV) glasanje (40-50 kHz) signalizira majci da je život mladunca ugrožen, što aktivira njeno intenzivno traženje i vraćanje mladunaca natrag u gnijezdo (Brudzynski, 2010). Ultrazvučno glasanje u odraslih i u mladunaca štakora kontrolira periakveduktalna siva tvar (slika 10) (Brunelli, 2005). Štakori proizvode ultrazvuk tijekom izdaha, na način sličan zviždanju. Ultrazvuk čuju zahvaljujući tonotopskim mjestima za ultrazvučne frekvencije u slušnom sustavu (Schwartz et al., 2012).





Slika 10. Položaj periakveduktalne sive tvari u mozgu (prema Berlant, 2003)

Ultrazvuk karakterizira značajno slabljenje s obzirom na udaljenost i lako se odbija od malih objekata poput grančica i travki. Također, ultrazvuk slabi s povećanjem vlage i koncentracije čestica prašine u zraku. Zbog navedenih razloga ultrazvuk se ne prenosi dobro na velike udaljenosti, međutim vjerojatnost da mladunac štakora odluta daleko od svog gnijezda je mala. Uzroci iz okoline mogu djelovati na razinu dozivanja, pa tako smanjenje temperature može povećati UZV dozivanje, dok miris stelje majčinog kaveza smanjuje dozivanje (Branchi et al., 2001). Također, lijekovi koji imaju anksiolitično djelovanje na GABA, opioidne i serotoninске receptore, poput SSRI, mogu uzrokovati smanjenje ultrazvučnog dozivanja štakora, dok anksioGENICI mogu povećati razinu ultrazvučnog dozivanja. Mladuncima štakora odvajanje od gnijezda i majke je jako stresno, na što ukazuju promjene u kardiovaskularnom sustavu, osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda i razini noradrenalina (Brunelli, 2005).

Test UZV dozivanja se sve više koristi prilikom istraživanja razvoja ponašanja, zbog nekoliko prednosti nad prijašnjim testovima: (i) ultrazvukovi su jedan od rijetkih odgovora mladunaca štakora na podražaje koji se mogu kvantitativno analizirati i izazvati mjerljivim podražajima; (ii) ultrazvučno dozivanje omogućuje analizu ponašanja tijekom rane postnatalne ontogenije; (iii) prilikom ovog testa rukovanje životinjama je minimalno (Branchi et al., 2001).

Ultrazvučno dozivanje štakora obuhvaća spektar od 20 do 100 kHz. U ovom rasponu s obzirom na svrhu postoje tri vrste UZV dozivanja: 22, 40 i 50 kHz. Dozivanje na 50 kHz karakteristično je za juvenilne i odrasle štakore. Ovi dozivi su kratkog trajanja (20-100ms), kreću se između frekvencija od 30-70 kHz i tipični su za socijalne interakcije, parenje i hranjenje. Dozivanje na 40 kHz karakteristično je za mladunce štakora. Ovi dozivi su kratkog trajanja (80-150 ms), a kreću se između frekvencija od 30-65 kHz. U brojnoj literaturi ovi su dozivi mjerilo osjećaja opasnosti i anksioznosti štakora, pogotovo zbog mogućnosti njihovog smanjenja ili čak potpunog izostanka nakon primjene lijekova. Dozivanje na 22 kHz karakteristično je za odrasle štakore. Ovi dozivi su dugog trajanja (300-3000 ms), a kreću se između frekvencija od 18-32 kHz. Tijekom ovog dozivanja štakori su u nepokretnom napetom stanju, a emitiraju zvuk za vrijeme jako dugog izdaha. Ova vrsta doziva izražava anksioznost i služi kao prijeteći signal drugim životinjama, što smanjuje vjerojatnost njihovog napada. Također, ovaj doziv služi kao upozorenje pripadnicima iste vrste o mogućoj opasnosti (Schwartz et al., 2012).

### 1.3.2. Povezanost serotonina sa poremećajima ponašanja

Uloga serotonina kao supresora ponašanja važna je radi razumijevanja poremećaja poput agresije i anksioznosti, a serotoninaska uloga u regulaciji neuroendokrinog sustava daje osnovu za razumijevanje poremećaja njegove ravnoteže u depresiji (Lucki, 1998).

Serotonergički neuroni imaju važnu ulogu u brojnim psihičkim poremećajima poput anksioznog poremećaja, depresije i shizofrenije te poremećajima ponašanja poput agresije, poremećaja hiperaktivnosti i deficita pažnje, raznih ovisnosti, opsesivno kompulzivnog poremećaja i poremećaja hranjenja (Strobel et al., 2003).

Anksiozni poremećaj karakteriziraju strah i fizička napetost, kao i tjelesni simptomi poput znojenja dlanova, tahikardije i podrhtavanja. U anksiozne poremećaje ubrajamo panični poremećaj, socijalnu fobiju, posttraumatski stresni poremećaj, opsesivno kompulzivni poremećaj te opći anksiozni poremećaj. U istraživanjima je primijećeno da polimorfizam gena za serotoniniski receptor 5-HT<sub>1A</sub> dovodi do pojave anksioznosti te se upotreba SSRI antidepresiva u terapiji pokazala učinkovitom (Olivier et al., 1998).

Depresija je jedan od najčešćih psihičkih poremećaja u svijetu. Po učestalosti u ukupnoj populaciji na visokom je četvrtom mjestu, dok u Hrvatskoj od ove bolesti boluje oko 300.000

ljudi. Karakteristični simptomi depresije su, uz sniženo raspoloženje, ravnodušnost, anhedonija, apatija, razdražljivost, nemir i pojačana napetost. Ljudi koji boluju od depresije često imaju ukočeno držanje, a usporeno mišljenje i govor često su rezultat psihomotorne usporenosti (Filipčić, 2008). Postoji nekoliko oblika depresije kao što su veliki depresivni poremećaj, ponavljani depresivni poremećaj, bipolarni poremećaj (manična depresija) i distimija. Brojne su teorije nastanka depresije, međutim jedna od njih, monoaminska teorija, predlaže da je uzrok pojave depresije poremećena ravnoteža serotonina i noradrenalina u mozgu. Naime, u depresiji dolazi do promjena u sintezi, unosu i razgradnji serotonina što dovodi do pojave smanjene koncentracije serotonina u sinapsi, te promjene broja i osjetljivosti serotonergičnih receptora (Elhwuegi, 2004).

Shizofrenija je ozbiljan kronični psihički poremećaj, čija je učestalost 1 oboljela osoba na 10.000 ljudi. Prvi simptomi se obično javljaju u dobi između 22 i 33 godine života (Häfner et al., 1997). Ova bolest pogađa sposobnost razmišljanja, otežana je percepcija stvarnosti, javlja se promjena ponašanja i poremećeno logičko razmišljanje te nemogućnost razlikovanja stvarnosti od nestvarnih doživljaja. Postoji nekoliko teorija nastanka shizofrenije, od kojih serotoninsko-dopaminska predlaže da do razvoja shizofrenije može dovesti povećana aktivnost serotoninskog sustava u supkortikalnim regijama, a smanjena u korteksu, smanjen broj serotoninskih 5-HT<sub>2</sub> receptora te poremećaji u signalnom putu serotonina (Picchioni et al., 2007).

Niske razine serotonina povezuju se i s agresivnim ponašanjem. Dokazano je da unos hrane sa smanjenom količinom triptofana, prekursorom serotonina, povećava agresivno ponašanje. Mutacija gena za serotoninske 5-HT<sub>7</sub> receptore također je povezana sa povećanim agresivnim ponašanjem. Smanjenje razine serotonina uzrokovano povećanom aktivnošću enzima MAOA povezano je sa povećanom agresijom i pojavom antisocijalnog poremećaja ličnosti (Seo et al., 2008).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati utjecaj povišene koncentracije serotonina u doba perinatalnog razvoja štakora na njihov razvoj i ponašanje. U tu svrhu smo tretirali jednu grupu životinja prekursorom sinteze serotonina, a drugu grupu inhibitorom razgradnje serotonina. Treća grupa životinja, tretirana fiziološkom otopinom, predstavljala je kontrolnu skupinu. Tretman se odvijao od 13. gestacijskog dana do okota indirektno, putem injiciranja majki, a od 1. do 21. postnatalnog dana direktno, injiciranjem mladunaca. Okoćenim mladuncima pratili smo stopu preživljenja i prirast tjelesne mase. Anksiozno ponašanje pratili smo testom ultrazvučnog dozivanja nakon izdvajanja iz legla, 13., 16., i 18. postnatalnog dana. Analizirali smo latenciju do prvog doziva, broj doziva, broj sljedova, duljinu dozivanja i frekvenciju s maksimalnom energijom dozivanja.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Životinje

U istraživanju su korišteni mladunci dobiveni parenjem 12 ženki i 4 mužjaka štakora soja Wistar, iz uzgoja Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Nakon dolaska u nastambu Zavoda za animalnu fiziologiju, štakori su se tjedan dana adaptirali na novu okolinu. Životinje su držane po 4 u kavezu, uz slobodan pristup hrani i vodi. Osvjetljenje je bilo namješteno na 12 sati svjetla i 12 sati mraka, a temperatura se održavala na  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Zatim je na tjedan dana u kavez s 3 ženke stavljen po jedan mužjak radi parenja. Nakon utvrđivanja trudnoće, mužjaci su uklonjeni iz kaveza, a ženke su nasumično raspoređene u skupine za farmakološki tretman. Dva dana prije okota ženke su razdvojene te su ostale pojedinačno smještene s leglom sve do odvajanja mladunaca.

### 3.1.2. Kemikalije

- 1M NaOH
- 0.1M NaOH
- 0.1M HCl
- 0.01M HCl
- 5-hydroxy-L-tryptophan (SIGMA-ALDRICH™, Njemačka)
- *trans*-2-Phenylcyclopropylamine hydrochloride (SIGMA-ALDRICH™, Njemačka)
- Fiziološka otopina (Pliva, Hrvatska)
- Metilensko modrilo (Kemika, Hrvatska)
- Deionizirana H<sub>2</sub>O

### 3.1.3. Pribor

- Štrcaljke (BD Plastipak™, Irska)
- Higijenski vateni štapići
- Mikroskopska predmetna stakla
- Igle (BD Microlance™, Irska)
- Staklene šprice (Hamilton Company™, Švicarska)
- pH metar (SCHOTT, Njemačka)
- Analitička vaga (KERN ABS, Njemačka)
- Elektronska vaga (AND Electronic balance, Kina)
- Magnetska mješalica (Elektrosanitarij H.Đendo, Hrvatska)
- Vorteks mješalica (IKA® VORTEX GENIUS 3, Njemačka)
- Vodena kupelj (Mettler GmbH Co. KG, Njemačka)
- Mikroskop (Olympus CX21, Japan)
- Hladnjak (+4°C)
- Računalo
- USB mikrofona (Dodotronic ultramic 200k)
- Neprozirna kutija sa poklopcem

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Provjera kopulacije

U periodu od tjedan dana boravka mužjaka sa ženkama svakodnevno je vršena provjera kopulacije uzimanjem brisa rodnice ženki. Prvo smo uzimali bris rodnice tako što bi higijenski vateni štapić prethodno umočen u fiziološku otopinu nježno ugurali u otvor rodnice i okrenuli ga par puta u smjeru kazaljke na satu i obrnuto od smjera kazaljke na satu. Zatim smo na predmetnom stakalcu napravili razmaz i fiksirali ga provlačenjem kroz plamen te ga obojili metilenskim modrilom. Nakon 15 minuta isprali smo stakalca deioniziranom vodom i zatim ih osušili upijajućim papirom. Razmaze smo pregledali uz pomoć mikroskopa na uvećanju 40x. Do kopulacije je došlo ukoliko su na razmazu bili vidljivi spermiji. Ženke kod kojih je kopulacija potvrđena smatrali smo gravidnima, što smo dodatno potvrdili praćenjem porasta njihove tjelesne mase.

### 3.2.2. Injiciranje

Štakori su s obzirom na tretman podijeljeni u tri skupine: 3 gravidne ženke su tretirane otopinom 5-hidroksitriptofana (5HTP, prekursorom serotonina, koncentracije 25 mg/kg), 6 ih je tretirano otopinom tranilcipromina (TCP, inhibitorom monoaminooksidaze, koncentracije 2 mg/kg) i preostale 3 ženke fiziološkom otopinom. Gravidne ženke injicirali smo subkutano na zatiljku od 13. dana trudnoće do dana okota, a zatim smo na isti način injicirali mladunce od 1. do 21. postnatalnog dana. Svakodnevno smo mjerili mase životinja, kako bismo im prilagodili volumen otopine. Prilikom injiciranja mladunaca pazili smo da ne bi došlo do miješanja mirisa iz različitih legla, što bi potencijalno dovelo do njihovog odbacivanja od strane majke. Iz tog razloga smo za svako leglo mijenjali rukavice i filter papire korištene kao podloga na vagi, te smo mladunce prije povratka majci lagano utrljali u stelju iz majčinog kaveza kako bi poprimili njezin miris. Uz to, mladunce smo za vrijeme injiciranja držali pod upaljenom stolnom lampom, kako bismo spriječili njihovo pothlađivanje.

### 3.2.3. Preživljenje i prirast tjelesne mase mladunaca

Kako bismo utvrdili točan broj preživjelih i uginulih mladunaca pratili smo okot svake ženke. Preživjelim mladuncima smo svakodnevno mjerili tjelesnu masu od 1. do 21. postnatalnog dana.

#### 3.2.4. Ultrazvučno dozivanje

Ultrazvučno dozivanje mladunaca snimali smo 13., 16. i 18. postnatalnog dana. Za snimanje smo koristili Dodotronic ultramic 200k i program Batsound Pro. Mladunce smo pojedinačno stavili u kutiju od stiropora dimenzija 27,4 x 26,7 x 18,6 cm s otvorom za mikrofona na vrhu desne stijenke i zatvorili kutiju. Snimali smo njihovo dozivanje 75 sekundi, nakon čega smo ih vratili leglu. Razinu anksioznosti zbog odvajanja od legla i majke procijenili smo analizom latencije do prvog doziva, brojem doziva, brojem sljedova i duljinom dozivanja. Zrelost dozivanja procijenili smo mjerenjem frekvencije doziva s maksimalnom energijom.

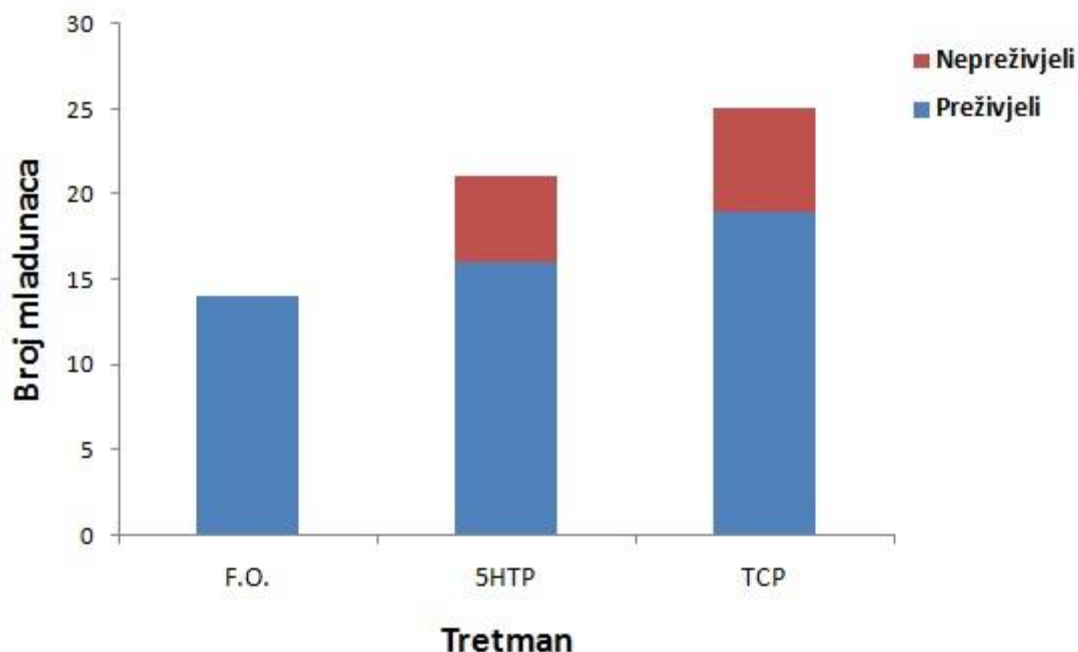
#### 3.2.5. Statistička analiza

Pri statističkoj obradi podataka koristili smo program GraphPadPrism 5. Za određivanje pravilnosti distribucije koristili smo Kolmogorov-Smirnov test. Pravilno distribuirane parametre usporedili smo jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s naknadnim Dunnettovim testom. Parametre koji nisu imali pravilnu distribuciju analizirali smo neparametrijskom Kruskal-Wallis (KW) analizom s naknadnim Dunnovim testom. U tekstu smo koristili srednju vrijednost (M, engl. *mean*)  $\pm$  standardnu devijaciju (SD, engl. *standard deviation*), a u grafičkom prikazu srednju vrijednost (M)  $\pm$  standardnu pogrešku (SEM, engl. *standard error mean*). Značajnost rezultata je prihvaćena kod  $p < 0,05$ . Tijekom statističke obrade rezultata isključili smo uzorke čije su vrijednosti odstupale od prosječne vrijednosti više od dvije standardne devijacije.

## 4. REZULTATI

### 4.1. PREŽIVLJENJE MLADUNACA

U skupini tretiranoj 5-HTP-om 3 ženke su okotile 21 mladunca od kojih je 16 preživjelo, a 5 ih je uginulo do 2. postnatalnog dana. Od ukupno 6 ženki tretiranih TCP-om jedna je okotila samo jednog mrtvorodenog mladunca, dok je preostalih 5 ženki okotilo ukupno 24 mladih. Od tih 24, 19 mladunaca je preživjelo, a 5 ih je uginulo do 3. postnatalnog dana. Sve tri ženke iz kontrolne skupine štakora su okotile žive mladunce, njih ukupno 14, od kojih su svi preživjeli (Slika 11).

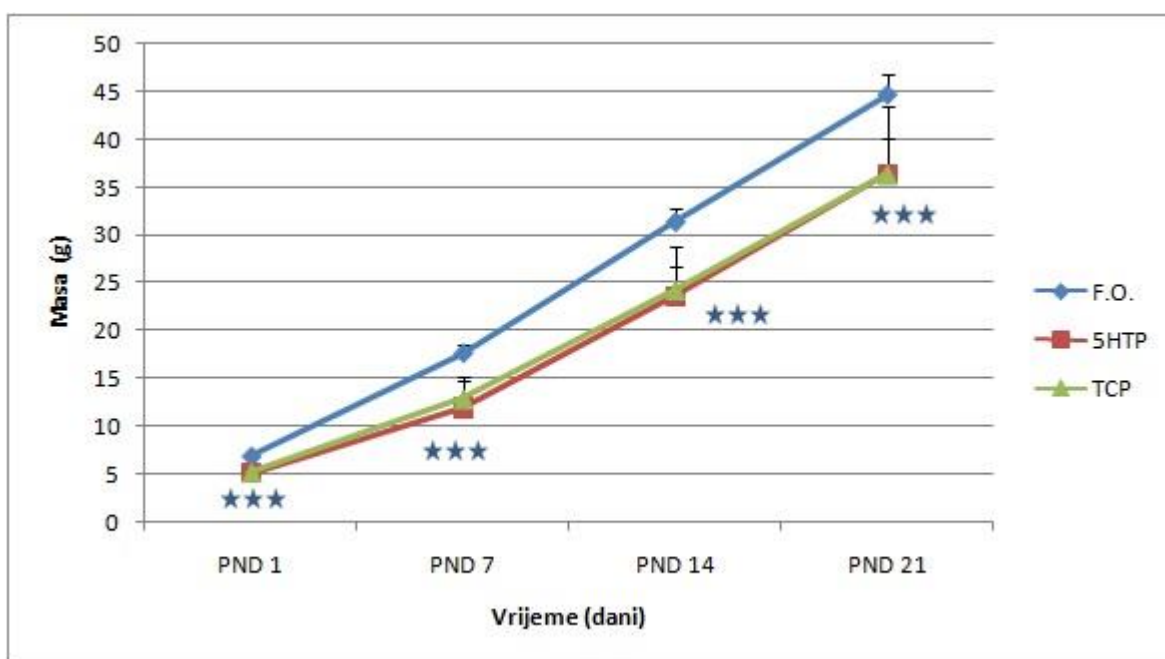


Slika 11. Preživljenje mladunaca u skupinama tretiranim fiziološkom otopinom (F.O., N=14), 5-hidroksitriptaminom (5HTP, N=21) i tranilciprominom (TCP, N=25).



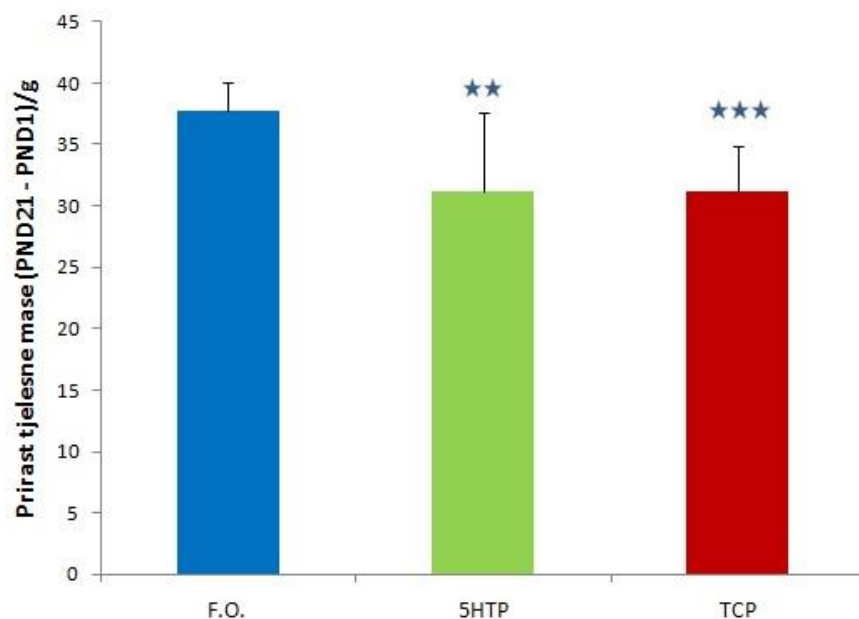
## 4.2. PRIRAST TJELESNE MASE

Utjecaj tretmana na tjelesnu masu bio je značajan u cijelom postnatalnom periodu ( $p < 0.001$ ). Pri tome su mladunci iz obje eksperimentalne skupine imali značajno nižu tjelesnu masu u usporedbi s kontrolnom skupinom 1. dana ( $6,8 \pm 0,28$  g F.O.,  $5,11 \pm 0,9$  g 5HTP i  $5,17 \pm 0,7$  g TCP), 7. dana ( $17,6 \pm 0,93$  g F.O.,  $11,9 \pm 2,9$  g 5HTP i  $12,86 \pm 2,5$  g TCP), 14. dana ( $31,3 \pm 1,38$  g F.O.,  $23,6 \pm 5,1$  g 5HTP i  $24,3 \pm 2,5$  g TCP), te 21. dana ( $44,6 \pm 2,23$  g F.O.,  $36,4 \pm 7,1$  g 5HTP i  $36,4 \pm 3,63$  g TCP) (slika 12.).



Slika 12. Tjelesna masa mladunaca tretiranih fiziološkom otopinom (F.O., N=14), 5-hidroksitriptaminom (5HTP, N=16) i tranilciprominom (TCP, N=19) tijekom postnatalnog tretmana. PND – postnatalni dan. Rezultati su prikazani kao  $M \pm SD$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , Dunnettov post-hoc test nakon analize varijanci.

Ukupni prirast tjelesne mase mladunaca, od 1. do 21. dana također je bio značajno veći u kontrolnoj skupini ( $37,8 \pm 2,2$  g) nego u skupinama tretiranim 5HTP-om ( $31,2 \pm 6,4$  g) ili TCP-om ( $31,2 \pm 3,6$  g) (Slika 13).

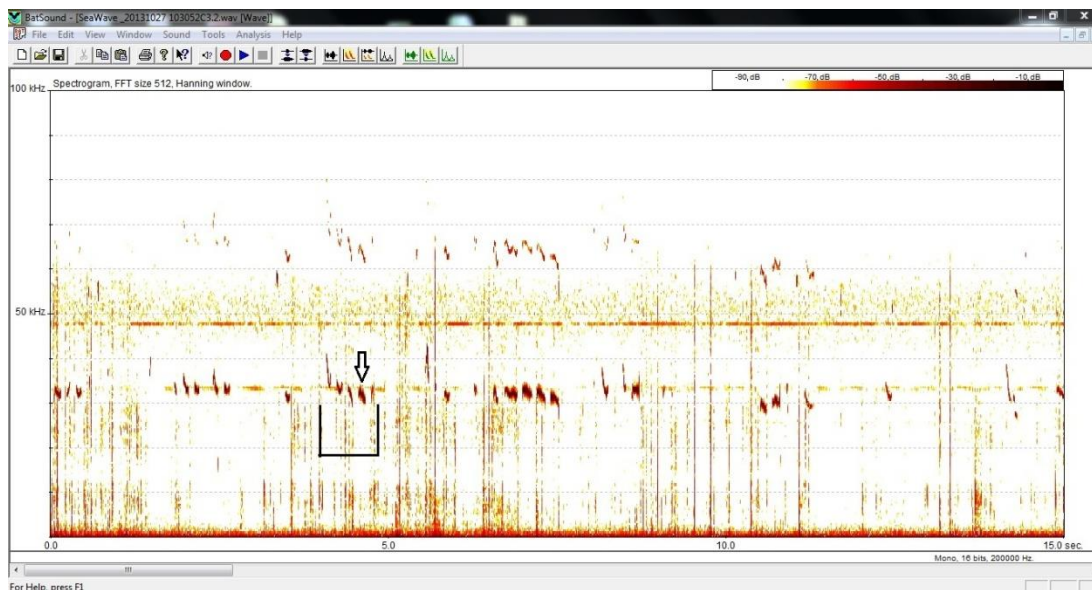


Slika 13. Prirast tjelesne mase mladunaca (PND21 - PND1) u skupinama tretiranim fiziološkom otopinom (F.O., N=14), 5-hidroksitriptaminom (5HTP, N=16) i tranilciprominom (TCP, N=19).

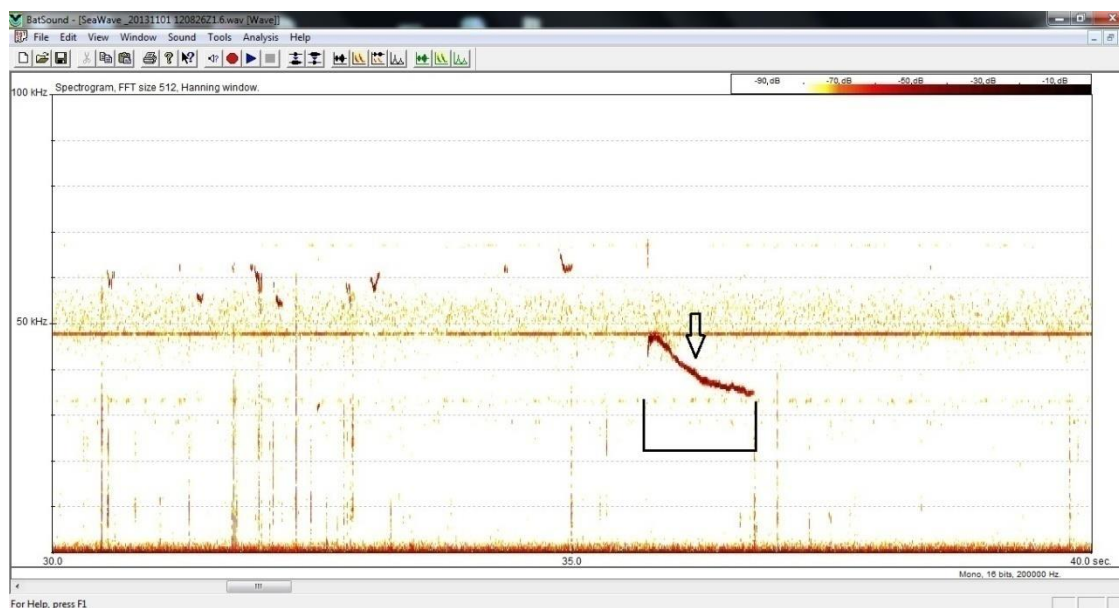
PND – postnatalni dan. Rezultati su prikazani kao  $M \pm SD$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Dunnettov post-hoc test nakon analize varijanci.

#### 4.3. ULTRAZVUČNO DOZIVANJE

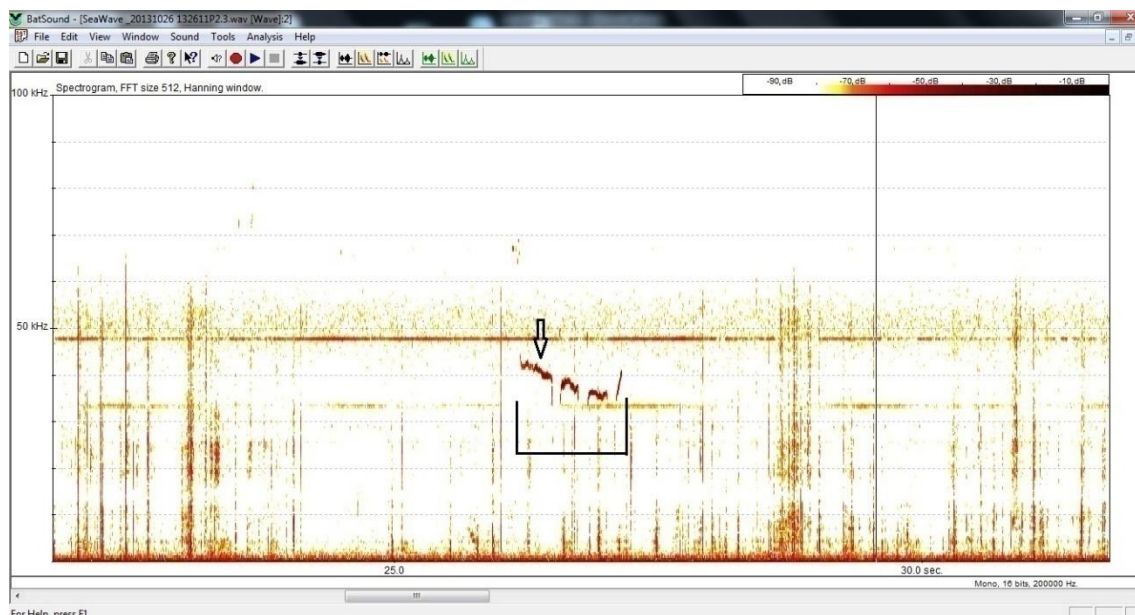
Razinu anksioznosti ispitali smo testom ultrazvučnog dozivanja. Slike 14., 15. i 16. prikazuju tipični prikaz glasanja mladunca iz pojedine skupine. Na slici možemo razlikovati dozive (označene strelicom) i sljedove (označene uglatom zagradom). Trajanje jednog doziva mjereno je u spektrogramu pozicioniranjem pokazivača na početku i na kraju određenog doziva. Slijed čini grupa doziva čija je međusobna udaljenost manja od 1 sekunde.



Slika 14. Spektrogram ultrazvučnog glasanja mladunca tretiranog TCP-om. Na slici možemo razlikovati doziv (označen strelicom) i slijed (označen uglatom zagradom). Na vertikalnoj osi prikazana je frekvencija (kHz), a na horizontalnoj osi vrijeme (s).



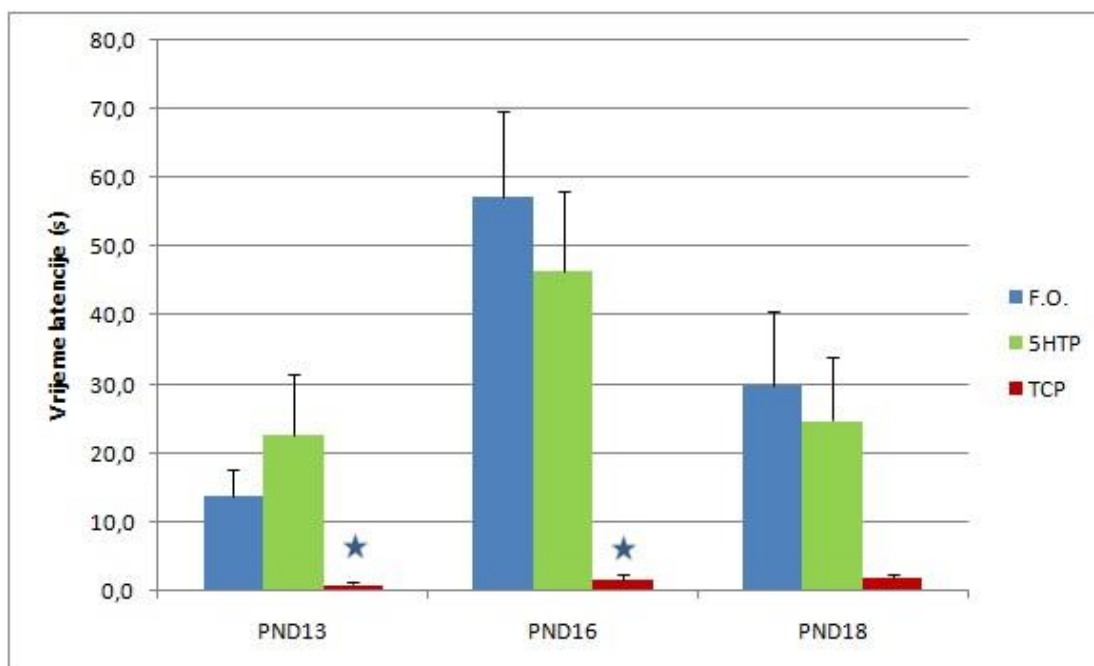
Slika 15. Spektrogram ultrazvučnog glasanja mladunca tretiranog 5HTP-om. Na slici možemo razlikovati doziv (označen strelicom) i slijed (označen uglatom zagradom). Na vertikalnoj osi prikazana je frekvencija (kHz), a na horizontalnoj osi vrijeme (s).



Slika 16. Spektrogram ultrazvučnog glasanja mladunca tretiranog sa fiziološkom otopinom. Na slici možemo razlikovati doziv (označen strelicom) i slijed (označen uglatom zagradom). Na vertikalnoj osi prikazana je frekvencija (kHz), a na horizontalnoj osi vrijeme (s).

#### 4.3.1. Vrijeme latencije

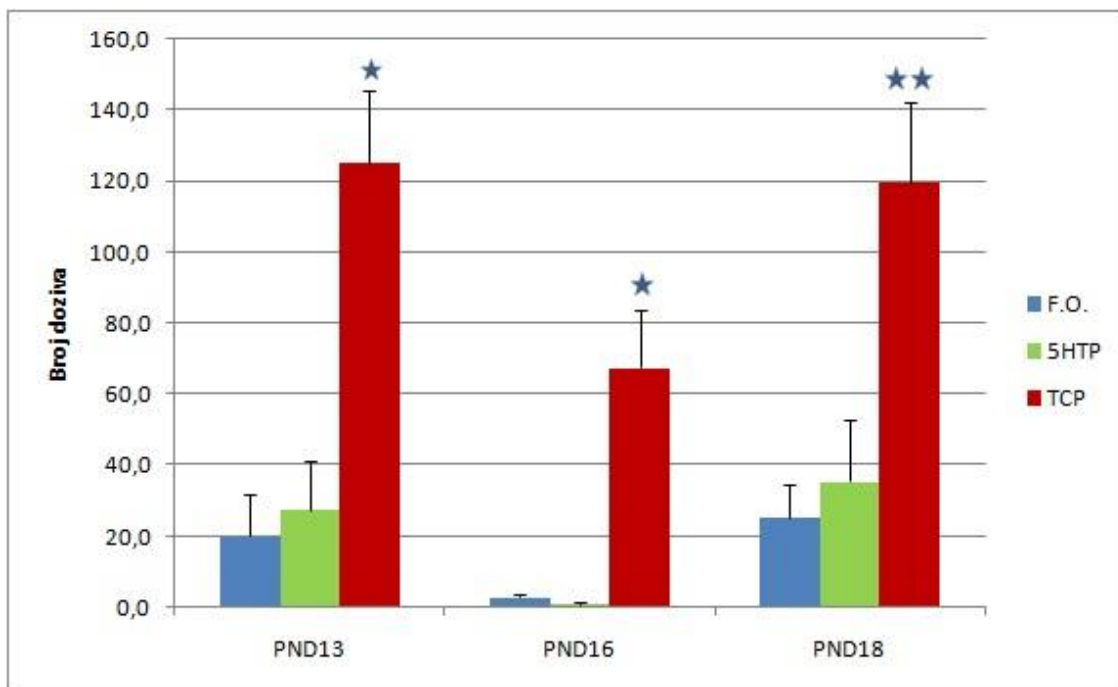
Utjecaj tretmana na vrijeme latencije do prvog doziva bio je značajan 13. (KW=11.37,  $p=0.0034$ ) i 16. (KW=9.54,  $p=0.0085$ ) dana, dok je 18. dana bio indikativan (KW=5.51,  $p=0.0637$ ). Mladunci u skupini tretiranoj tranilciprominom imali su vrlo kratko vrijeme latencije do prvog doziva u sva tri dana (13. dana  $0.92 \pm 1.11$  s; 16. dana  $1.62 \pm 2.22$  s i 18. dana  $1.85 \pm 2.68$  s) u usporedbi s kontrolnom skupinom (13. dana  $13.82 \pm 7.42$  s, 16. dana  $57.47 \pm 24.49$  s i 18. dana  $29.78 \pm 34.06$  s). Razlika je 13. i 16. dana bila značajna, no ta se značajnost 18. dana izgubila zbog velikih standardnih devijacija u obje skupine. Vremena latencije do prvog doziva skupine tretirane 5-hidroksitriptofanom nisu se značajno razlikovale od vrijednosti kontrolne skupine (13. dana  $22.67 \pm 26.18$  s, 16. dana  $46.51 \pm 34.46$  s i 18. dana  $24.74 \pm 31.62$  s).



Slika 17. Usporedba latencije do prvog doziva u skupinama tretiranim fiziološkom otopinom (F.O.), 5-hidroksitriptaminom (5HTP) i tranilciprominom (TCP) 13. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=9$ ;  $N_{TCP}=7$ ), 16. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=9$ ;  $N_{TCP}=7$ ) i 18. ( $N_{F.O.}=10$ ;  $N_{5HTP}=12$ ;  $N_{TCP}=16$ ) postnatalnog dana (PND). Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ ; \* $p < 0.05$ , Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallis testa.

#### 4.3.2. Broj doziva

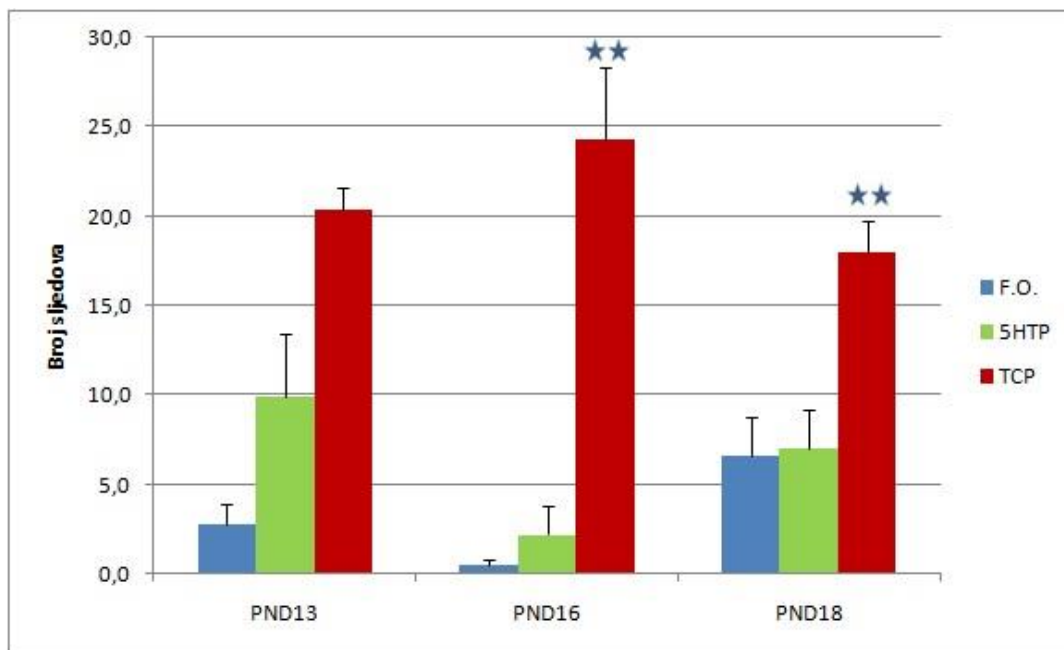
Utjecaj tretmana na broj doziva bio je značajan 13. (KW=10.14,  $p=0.0063$ ), 16. (KW=13.59,  $p=0.001$ ) i 18. dana (KW=13.76,  $p=0.001$ ). Mladunci u skupini tretiranoj tranilciprominom imali su značajno veći broj doziva u usporedbi s kontrolnom skupinom 13. dana ( $125 \pm 50.74$  naspram  $20 \pm 24.22$ ), 16. dana ( $67.57 \pm 42.08$  naspram  $3 \pm 3.46$ ), te 18. dana ( $119.6 \pm 88.27$  naspram  $25.3 \pm 28.97$ ). Broj doziva skupine tretirane 5-hidroksitriptofanom nije se značajno razlikovao od onog u kontrolnoj skupini (13. dana  $27.38 \pm 39.03$ , 16. dana  $1 \pm 1.60$  i 18. dana  $35.5 \pm 59.59$ ).



Slika 18. Broj doziva u skupinama tretiranim fiziološkom otopinom (F.O.), 5-hidroksitriptaminom (5HTP) i tranilciprominom (TCP) 13. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=8$ ;  $N_{TCP}=6$ ), 16. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=8$ ;  $N_{TCP}=7$ ) i 18. ( $N_{F.O.}=10$ ;  $N_{5HTP}=12$ ;  $N_{TCP}=15$ ) postnatalnog dana (PND). Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallis testa.

#### 4.3.3. Broj sljedova

Utjecaj tretmana na broj sljedova bio je na granici statističke značajnosti 13. dana ( $KW=5.89$ ,  $p=0.0526$ ), ali postaje vrlo značajan 16. ( $KW=13.10$ ,  $p=0.0014$ ) i 18. dana ( $KW=15.00$ ,  $p=0.0006$ ). Mladunci u skupini tretiranoj tranilciprominom imali su puno veći broj sljedova u odnosu na kontrolnu skupinu 13. ( $20.33 \pm 3.20$  naspram  $2.75 \pm 2.22$ ), 16. ( $24.29 \pm 10.70$  naspram  $0.5 \pm 0.58$ ) i 18. dana ( $18 \pm 6.96$  naspram  $6.6 \pm 6.79$ ), no razlika je bila statistički značajna samo 16. i 18. dana. Broj sljedova skupine tretirane 5-hidroksitriptofanom nije se značajno razlikovao od kontrolne skupine ( $9.89 \pm 10.55$  13. dana,  $2.22 \pm 4.87$  16. dana i  $7 \pm 7.69$  18. dana).

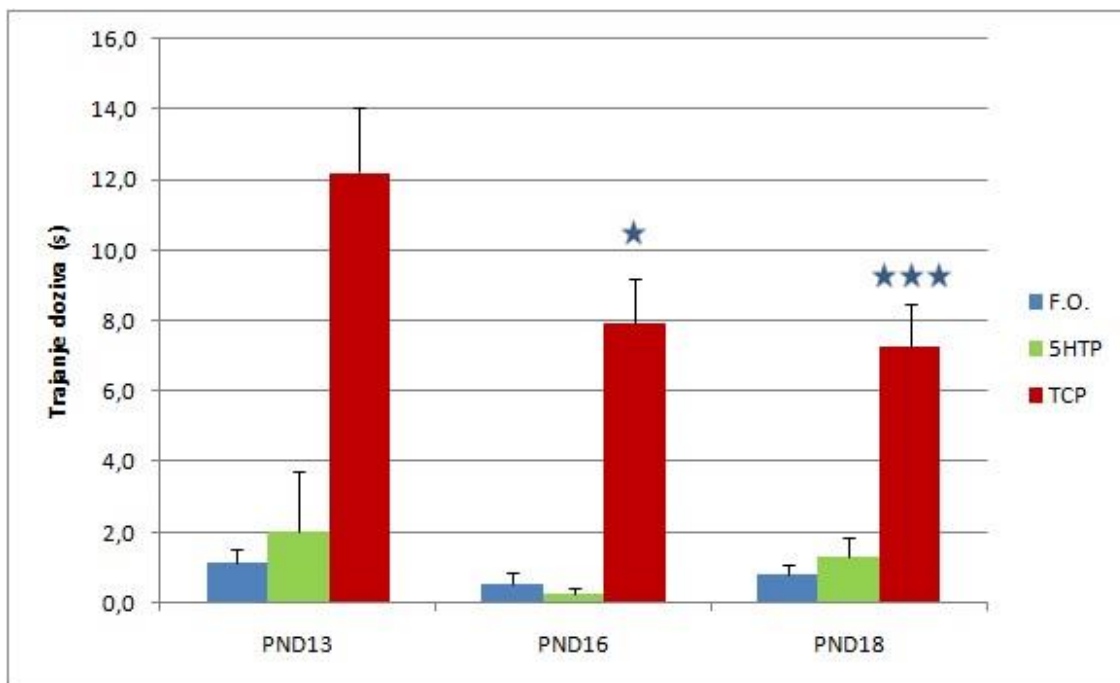


Slika 19. Usporedba broja sljedova u skupinama tretiranim fiziološkom otopinom (F.O.), 5-hidroksitriptaminom (5HTP) i tranilciprominom (TCP) 13. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=9$ ;  $N_{TCP}=6$ ), 16. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=9$ ;  $N_{TCP}=7$ ) i 18. ( $N_{F.O.}=10$ ;  $N_{5HTP}=12$ ;  $N_{TCP}=16$ ) postnatalnog dana (PND). Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ ;  $**p < 0.01$ , Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallis testa.

#### 4.3.4. Trajanje doziva

Utjecaj tretmana na trajanje doziva bio je značajan 13. ( $KW=9.09$ ,  $p=0.0106$ ), 16. ( $KW=13.84$ ,  $p=0.001$ ) i 18. dana ( $KW=20.33$ ,  $p<0.0001$ ). Dozivi mladunca u skupini tretiranoj tranilciprominom trajali su znatno dulje od doziva mladunaca tretiranih fiziološkom otopinom 13. ( $12.22 \pm 4.12$  s naspram  $1.16 \pm 0.75$  s), 16. ( $7.93 \pm 3.41$  s naspram  $0.54 \pm 0.63$  s) i 18. dana ( $7.26 \pm 4.82$  s naspram  $0.80 \pm 0.94$  s), što je 16. i 18. dana bilo statistički značajno. Trajanje doziva u skupini tretiranoj 5-hidroksitriptofanom bilo je vrlo slično onome u kontrolnoj skupini (13. dana  $2.03 \pm 4.53$  s, 16. dana  $0.26 \pm 0.41$  s i 18. dana  $1.30 \pm 1.94$  s).



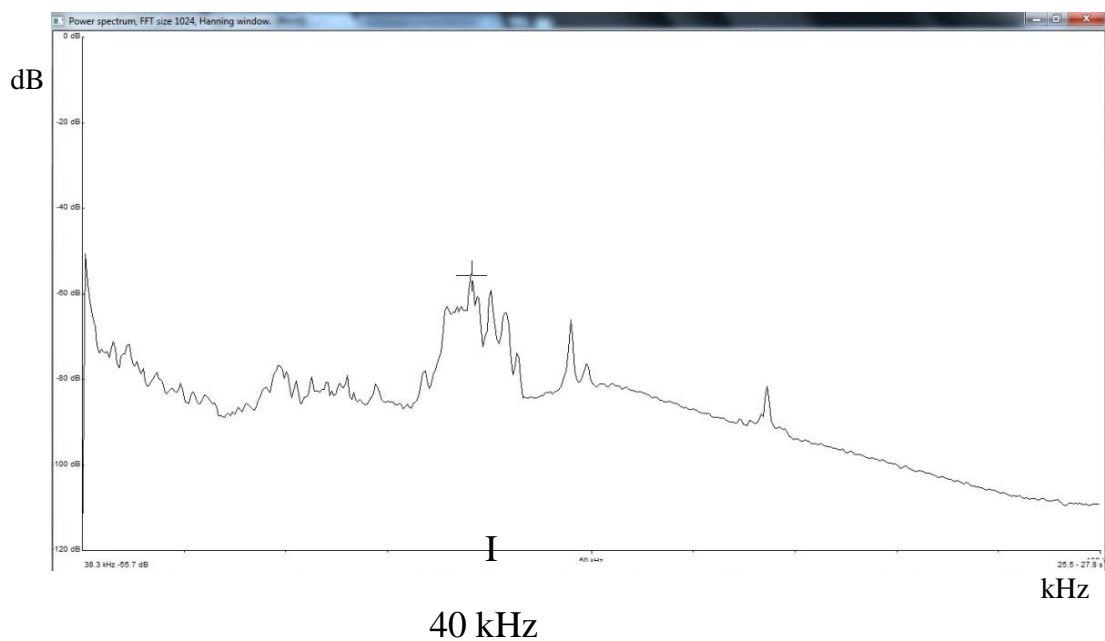


Slika 20. Usporedba trajanja doziva u skupinama tretiranim fiziološkom otopinom (F.O.), 5-hidroksitriptaminom (5HTP) i tranilciprominom (TCP) 13. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=7$ ;  $N_{TCP}=5$ ), 16. ( $N_{F.O.}=4$ ;  $N_{5HTP}=9$ ;  $N_{TCP}=7$ ) i 18. ( $N_{F.O.}=10$ ;  $N_{5HTP}=12$ ;  $N_{TCP}=16$ ) postnatalnog dana (PND). Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ ; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , Dunnova post-hoc analiza nakon Kruskal-Wallis testa.

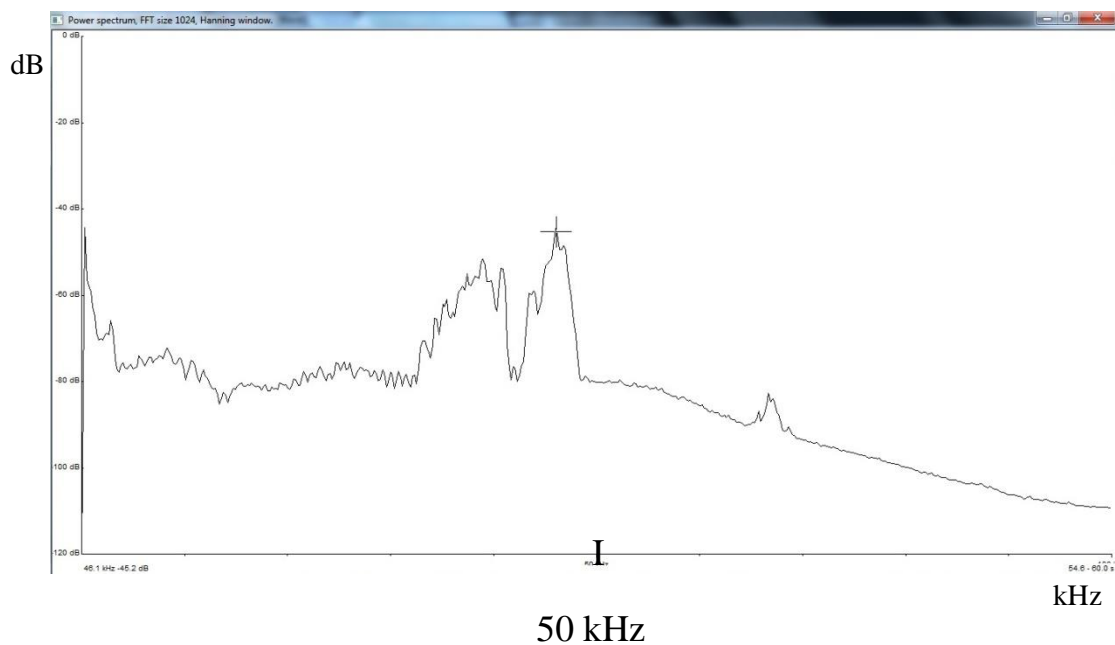
#### 4.3.5. Frekvencija maksimalne energije dozivanja

U spektru snage mjeri se frekvencija maksimalne energije, koju predstavlja najviša točka u grafičkom prikazu (slike 21. i 22.).





Slika 21. Spektar snage ultrazvučnog glasanja mladunca iz kontrolne skupine 13. dana. Znakom + označena je frekvencija (40 kHz) pri kojoj je postignuta maksimalna energije dozivanja.



Slika 22. Spektar snage ultrazvučnog glasanja mladunca iz kontrolne skupine 16. dana. Znakom + označena je frekvencija (50 kHz) pri kojoj je postignuta maksimalna energije dozivanja.

Razlike u frekvenciji maksimalne energije dozivanja između skupina prikazane su u tablici 1, iz koje je vidljivo da je 13. dana u svim skupinama maksimalna energija dozivanja na frekvenciji od oko 40kHz, 16. dana u eksperimentalnim skupinama frekvencija je i dalje 40 kHz, dok je u kontrolnoj skupini 50 kHz, a 18. dana u skupini tretiranoj tranilciprominom maksimalna energija je i dalje na frekvenciji od oko 40 kHz, dok je u ostale dvije skupine na frekvenciji od oko 50 kHz.

Tablica 1. Razlike u frekvenciji maksimalne energije dozivanja (kHz) između skupina po danima.

	PND 13	PND 16	PND 18
TCP	40	40	40
5HTP	40	40	50
Fiziološka otopina	40	50	50

## 5. RASPRAVA

### 5.1. TRETMAN 5-HTP-om i TCP-om

5-HTP je neposredni prekursor serotonina pa njegovim dodavanjem u organizmu raste i koncentracija serotonina. Iako se i triptofan može koristiti za perinatalno povećanje razine serotonina, pokazalo se da 5-HTP ima određene prednosti. Triptofan, kao esencijalna aminokiselina, ima brojne druge uloge u organizmu i samo se 1-2% ukupnog triptofana koristi za sintezu serotonina. 5-hidroksitriptofan je pronađen samo u putu sinteze serotonina i kvantitativno se pretvara u serotonin. Primjena 5-HTP je bolja i od samog serotonina jer 5-HTP može prijeći placentarnu barijeru, što je izuzetno važno u prenatalnom dijelu tretmana (Blažević et al., 2011).

Izoenzimi MAOA i MAOB kataliziraju oksidativnu deaminaciju neurotransmitora i biogenih amina. U normalnim fiziološkim uvjetima MAOA oksidira serotonin i noradrenalin, dok MAOB oksidira feniletilamin. Međutim, oba mogu oksidirati iste tvari i ukoliko dođe do inhibicije jednog od izoenzima, drugi izoenzim može preuzeti njegovu funkciju. Tranilcipromin je inhibitor monoaminooksidaze A i B, čime sprječava razgradnju serotonina, noradrenalina i dopamina. Primijećen je veći učinak na metabolizam serotonina štakora ukoliko su inhibirane obje izoforme, nego kada je inhibirana samo monoaminooksidaza A (Blažević et al., 2010).

U prijašnjem istraživanju pokazano je da primjena 5-HTP-a izaziva značajan porast koncentracije serotonina samo u perifernom odjeljku (u vidu hiperserotoninemije), dok primjena TCP-a izaziva značajan porast koncentracije serotonina i na periferiji i u središnjem odjeljku (Hranilović et al., 2011). U tom smislu, posljedice tretmana koje su zajedničke životinjama iz obje eksperimentalne skupine možemo prvenstveno smatrati rezultatom narušavanja periferne homeostaze serotonina, dok posljedice svojstvene samo skupini štakora tretiranih TCP-om možemo prvenstveno smatrati rezultatom narušavanja homeostaze serotonina u središnjem odjeljku.

## 5.2. PERIFERNI UČINCI TRETMANA

Obje eksperimentalne skupine značajno su se razlikovale od kontrolne u preživljenju i tjelesnoj masi mladunaca.

Iz rezultata možemo vidjeti da je oko 25% mladunaca tretiranih 5-HTP-om i oko 20% mladunaca tretiranih TCP-om uginulo neposredno prije, tijekom ili unutar 48 sati nakon okota, dok su svi mladunci iz kontrolne skupine preživjeli. Uzrok slabijeg preživljenja u eksperimentalnim skupinama mogle bi biti promjene u uteroplacentarnom protoku krvi. Normalnu trudnoću karakterizira smanjenje vaskularnog otpora sustava povezanog sa smanjenjem arterijskog krvnog tlaka, povećanjem srčanog minutnog volumena, stimulacijom sustava renin-angiotenzin i porastom volumena plazme. Ove promjene uzrokuju značajno povećanje u uteroplacentarnom protoku krvi, što omogućuje normalan rast fetusa. Pokazano je da primjena 5-HTP-a u gravidnih ženki štakora izaziva promjene bubrežnih funkcija i smanjuje povećanje volumena plazme. Smanjeni volumen plazme dovodi do smanjenja srčanog minutnog volumena i značajnog smanjenja u uteroplacentarnom protoku krvi što može onemogućiti normalan razvoj fetusa. Serotonin također ima vazokonstriktorski efekt na pupčane i korionske arterije, zbog čega dodatno može smanjiti placentarni protok krvi (Duvekot et al., 1995; Salas et al., 2007).

Osim što su mladunci iz obje eksperimentalne skupine životinja imali značajno nižu tjelesnu masu nakon okota, što može biti posljedica nedovoljne opskrbe hranjivim tvarima zbog gore opisanog smanjenja u protoku krvi kroz placentu, njihova masa ostala je značajno manja i tijekom cijelog postnatalnog razvoja. To ukazuje na učinak povišenih koncentracija serotonina tijekom postnatalnog tretmana na stopu metabolizma ili skladištenje energetske rezerve u mladunaca. Pokazano je da serotonin povećava stopu metabolizma na način da aktivira peristaltiku crijeva (Camilleri, 2009), kao i da utječe na otpuštanje inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače (Paulmann et al., 2009). Iako smanjeni prirast tjelesne mase mladunaca smatramo prvenstveno perifernim učinkom, moguće je da je on posljedica i neravnoteže u središnjem odjeljku serotonina. Poznato je da serotonin regulira osjećaj sitosti, smanjuje količinu unosa hrane i učestalost hranjenja (Lucki, 1998). Životinje tretirane TCP-om doista imaju povišenu koncentraciju 5-HT u mozgu, dok je u životinja tretiranih 5-HTP-om (zbog nepostojanja krvno-

moždane barijere u perinatalnom razdoblju) suvišak serotonina iz krvi mogao negativno utjecati na mehanizme kontrole hranjenja.

### 5.3. SREDIŠNJI UČINCI TRETMANA

Promjene u anksioznom ponašanju rezultat su neravnoteže 5-HT u središnjem odjeljku. Činjenica da brojni lijekovi koji imaju anksiolitičko djelovanje na ljude mogu reducirati ili u potpunosti ukloniti ultrazvučno dozivanje u štakora (Schwartz et al., 2012), ukazuje na to da je test ultrazvučnog dozivanja nakon odvajanja iz legla dobra mjera za razinu anksioznosti u mladunaca. Životinje tretirane TCP-om značajno su se razlikovale od kontrolnih životinja u vrijednostima svih mjerenih parametara ultrazvučnog dozivanja koji ukazuju na razinu anksioznosti. Za razliku od njih, vrijednosti u životinja tretiranih 5-HTP-om bile su tek blago, neznačajno promijenjene. Pretpostavljamo da je uzrok povećane anksioznosti u mladunaca tretiranih TCP-om značajno povećanje koncentracije serotonina u prefrontalnoj kori. Ovaj rezultat u skladu je s višestruko pokazanim djelovanjem agonista 5-HT<sub>1A</sub> receptora na smanjenje ultrazvučnog dozivanja u mladunaca štakora (Branchi et al., 2001). Naime, 5-HT<sub>1A</sub> receptor djeluje kao autoreceptor u neuronima jezgara rafe i njegova aktivacija smanjuje otpuštanje serotonina na aksonskim završecima. Moguće je također da je povećana anksioznost u mladunaca tretiranih TCP-om posljedica povišenja razina dopamina i noradrenalina koji reguliraju reaktivnost na podražaje iz okoline, a čiju razgradnju TCP također sprječava.

Osim parametara koji su mjerili razinu anksioznosti, u testu ultrazvučnog dozivanja analizirali smo i frekvenciju pri kojoj se dozivanje odvija. Frekvencija ultrazvučnog dozivanja mijenja se dozrijevanjem životinje. Dozivanje na 50 kHz karakteristično je za juvenilne i odrasle štakore, a tipični su za socijalne interakcije, parenje i hranjenje. Dozivanje na 40 kHz karakteristično je za mladunce štakora, a ovi dozivi su mjerilo osjećaja opasnosti i anksioznosti štakora (Schwartz et al., 2012). Neki autori smatraju da dozivanja na 40kHz treba početi mjeriti od 3. do 5. postnatalnog dana, s tim da se maksimalni broj doziva postiže oko 5. do 10. postnatalnog dana. Nakon 10. dana dozivi na 40 kHz prestaju (Olivier et al., 1998; Schwartz et al., 2012). Drugi autori govore da dozivanja na 40 kHz traju do PND 14, kada započinju dozivanja na 50 kHz (Brudzynski, 2010; Brunelli et al., 1997; Hofer et al., 1978). Naši rezultati govore u prilog

potonjim opažanjima jer životinje u kontrolnoj skupini mijenjaju frekvenciju maksimalne energije dozivanja između 13. i 16. postnatalnog dana. Za razliku od njih, životinje iz eksperimentalnih skupina pokazuju kašnjenje u prebacivanju na višu frekvenciju – u grupi tretiranoj 5-HTP-om ona se zbiva između 16. i 18. dana, dok se u grupi tretiranoj TCP-om frekvencija od 40 kHz zadržala i 18. dana starosti. Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da povišene koncentracije serotonina negativno djeluju na sazrijevanje mladunaca, blaže indirektno (putem povišene razine 5-HT u krvi uzrokovane 5-HTP-om), a jače direktno (putem povišenja razine 5-HT u mozgu uzrokovane TCP-om).

## 6. ZAKLJUČAK

1. U usporedbi s kontrolnim životinjama, štakori tretirani 5-HTP-om i TCP-om imali su znatno manju stopu preživljenja, dok su preživjeli novorođeni mladunci bili značajno manje tjelesne mase. Pretpostavljamo da je to prvenstveno posljedica povišenja razine serotonina u krvi majki, koja je dovela do smanjenog uteroplacentarnog protoka krvi i nedovoljne opskrbe mladunaca hranjivim tvarima i/ili kisikom.
2. Tijekom prva tri postnatalna tjedna, mladunci iz obje eksperimentalne skupine imali su značajno manji prirast tjelesne mase u odnosu na mladunce iz kontrolne skupine. Pretpostavljamo da je povišenje razine serotonina u perifernom odjeljku utjecalo na metabolizam i skladištenje energetske zaliha u mladunaca.
3. U testu ultrazvučnog dozivanja nakon izdvajanja iz legla, životinje tretirane TCP-om imale su značajno kraće vrijeme latencije do prvog doziva te značajno veći broj doziva, sljedova doziva i ukupno trajanje dozivanja u odnosu na skupinu tretiranu fiziološkom otopinom, dok su u životinja tretiranih 5-HTP-om ove vrijednosti bile slične kontrolnima. Smatramo da je povećanje koncentracije serotonina u prefrontalnoj kori mozga životinja tretiranih TCP-om izazvao povišenu razinu anksioznosti.
4. U obje eksperimentalne skupine primijetili smo kasniju dob prebacivanja frekvencije ultrazvučnog dozivanja s infantilne na juvenilnu (u životinja tretiranih 5-HTP-om iza 16., a u životinja tretiranih TCP-om iza 18. dana starosti). Možemo pretpostaviti da povišene koncentracije serotonina negativno djeluju na sazrijevanje mladunaca, pri čemu indirektni učinak povišene razine 5-HT u krvi (uzrokovane 5-HTP-om) blaži, a direktni učinak povišene razine 5-HT u mozgu (uzrokovane TCP-om) jači.

## 7. LITERATURA

- Abbott N.J. (2002): Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *Journal of Anatomy* **200**; 523 – 534
- Amireault P., Sibon D., Cote F. (2012): Life without peripheral serotonin: Insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chemical Neuroscience* **4**; 64 – 71
- Azmitia E.C. (2001): Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin* **56**; 413 – 424
- Berger M., Gray J.A., Roth B.L. (2009): The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine* **60**; 355 – 366
- Berlant J.L. (2003): Antiepileptic treatment of posttraumatic stress disorder. *Primary Psychiatry* **10**; 41 – 49
- Blažević S., Jurčić Ž, Hranilović D. (2010): Perinatal treatment of rats with MAO inhibitor tranylcypromine. *Translational Neuroscience* **1**; 49 – 54
- Blažević S., Dolenec P., Hranilović D. (2011): Physiological consequences of perinatal treatment of rats with 5-hydroxytryptophan. *Periodicum Biologorum* **113**; 81 – 86
- Branchi I., Santucci D., Alleva E. (2001): Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behavioural Brain Research* **125**; 49 – 56
- Brudzynski S.M. (2010): Handbook of mammalian vocalization; an integrative neuroscience approach. Elsevier, UK.
- Brunelli S., Vinocur D., Soo-Hoo D., Hofer M. (1997): Five Generations of Selective Breeding for Ultrasonic Vocalization (USV) Responses in N:NIH Strain Rats. *Developmental Psychobiology* **31**; 255 – 265
- Brunelli S. (2005): Selective Breeding for an Infant Phenotype: Rat Pup Ultrasonic Vocalization (USV). *Behavior Genetics* **35**; 53 – 65
- Camilleri M. (2009): Serotonin in the Gastrointestinal Tract. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* **16**; 53 – 59
- Cook E.H., Leventhal B.L. (1996): The serotonin system in autism. *Current Opinion in Pediatrics* **8**; 348 – 354
- Duvekot J.J., Cheriex E.C., Pieters F.A.A., Menheere P.P.C.A., Schouten H.J.A., Peeters L.L.H. (1995): *Obstetrics & Gynecology* **85**; 361 – 367



- Elhwuegi A.S. (2004): Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **28**; 435 – 451
- Filipčić I. (2008): Učestalost depresije i utjecaj liječenja depresije na kvalitetu života bolesnika koji boluju od kroničnih tjelesnih bolesti. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.
- Graeff F.G. (2002): On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology* **163**, 467 – 476
- Häfner H., Heiden W. (1997): Epidemiology of Schizophrenia. *Canadian Journal of Psychiatry* **42**; 139 – 151
- Hofer M.A., Shair H. (1978): Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. *Developmental Psychobiology* **11**, 495 – 504
- Hranilović et al. (2011): The effects of the perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranylcypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochemistry International* **59**; 202 – 207
- Kolb B., Whishaw I.Q. (2011): An Introduction to Brain and Behavior. Worth Publishers, New York.
- Kshama D., Hrishikeshavan H.J., Shanbhogue R., Munonyedi U.S. (1990): Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. *Behavioral and Neural Biology* **54**, 234 – 253
- Lesch K.P., Mössner R. (1998): Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biological Psychiatry* **44**; 179 – 192
- Lopez-Vilchez I., Diaz-Ricart M., White J.G., Escolar G., Galan A.M. (2009): Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. *Cardiovascular research* **84**; 309 – 316
- Lucki I. (1998): The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin. *Society of Biological Psychiatry* **44**; 151 – 162
- Mai J.K., Paxinos G. (2004): The Human Nervous System. Elsevier, UK.
- McManis P.G., Talley N.J. (1997): Nausea and Vomiting Associated With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *CNS drugs* **8**; 394 – 401
- Melikian H.E. (2004): Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacology & Therapeutics* **104**; 17 – 27

Mohammad-Zadeh L.F., Moses L., Gwaltney-Brant S.M. (2008): Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **31**; 187 – 199

National Collaborating Centre for Mental Health (UK) (2010): Depression: The Treatment and Management of Depression in Adults (Updated Edition). British Psychological Society, UK.

Olivier B., Molewijk H.E., van der Heyden J.A., van Oorschot R., Ronken E., Mos J., Miczek K.A. (1998): Ultrasonic vocalizations in rat pups: effects of serotonergic ligands. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **23**; 215 – 227

Paulmann N., Grohmann M., Voigt J. P., Bert B., Vowinckel J., Bader M., Skelin M., Jevsek M., Fink H., Rupnik M., Walther D. J. (2009): Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol.* **7**, e1000229

Picchioni M.M., Murray R.N. (2007): Schizophrenia. *British Medical Journal* **335**; 91 – 95

Racke K., Reimann A., Schwörer H., Kilbinger H. (1996): Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural brain research* **73**; 83 – 87

Salas S.P., Giacaman A., Romero W., Downey P., Aranda E., Mazzano D., Vio C.P. (2007): Pregnant rats treated with a serotonin precursor have reduced fetal weight and lower plasma volume and kallikrein levels. *Hypertension* **50**; 773 – 779

Schwartz R.K.W., Wöhr M. (2012): On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **45**; 337 – 348

Seo D., Patrick C.J. (2008): Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and its Comorbidity with other Clinical Disorders. *Aggression and Violent Behavior* **13**; 383 – 395

Sirek A., Sirek O.V. (1970): Serotonin: A review. *Canadian Medical Association Journal* **102**; 846 – 849

Strobel A., Gutknecht L., Rothe C., Mössner R., Zeng Y., Brocke B., Lesch K.P. (2003): Allelic variation in 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits. *Journal of Neural Transmission* **110**; 1445 – 1453

Whitaker-Azmitia P.M., Druse M., Walker P., Lauder J.M. (1996): Serotonin as a developmental signal. *Behavioural Brain Research* **73**; 19 – 29

Whitaker-Azmitia P.M. (2001): Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin* **56**; 479 – 485

<https://www.cnsforum.com>

<http://www.cmaj.ca/content/180/3/305/F1.expansion.html>

<http://www.nature.com/nri/index.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin\\_syndrome](http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin_syndrome)

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNİ PODACI

Ime i prezime:	Mirna Merkler
Datum i mjesto rođenja:	22. siječnja 1991., Zagreb
Adresa:	Nova Ves 79, 10 000 Zagreb
Telefon:	01 4667 771, 098 9760 565
E-mail:	mirna_merkler@yahoo.com

### ŠKOLOVANJE

rujan 2005. – lipanj 2009. X. gimnazija „Ivan Supek“, Zagreb

rujan 2009. – rujan 2012. Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb  
Smjer: preddiplomski studij Znanosti o okolišu

rujan 2012. – veljača 2015. Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb  
Smjer: diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul  
Fiziologija i imunobiologija

### RADNO ISKUSTVO

travanj 2013. – lipanj 2013. Studentska praksa  
Imunološki zavod, Odjel za istraživanje i razvoj, Zagreb

- Citofotometrijske metode, rad sa ljudskim krvnim stanicama i animalnim virusima

lipanj 2014. – listopad 2014. IAESTE studentska praksa  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Szczecin, Poljska

- Rad u internacionalnom i interdisciplinarnom timu na pronalasku polimorfizama gena WNT10B, TCF12, CTNNAL1 i prolaktin receptor gena te njihovom utjecaju na reprodukciju svinja

## ZNANJA I VJEŠTINE

Rad na računalu	svakodnevno korištenje alata MS Office™
Strani jezici	Engleski: odlično znanje (položen TOEFL iBT)
	Njemački: osnovno znanje
	Talijanski: osnovno znanje
Vozačka dozvola	B kategorija

## DODATNE INFORMACIJE

### Prezentacije

Faktori razvoja kooperacije; nagrada za poster prezentaciju na NeuRI studentskom kongresu neuroznanosti u Rijeci 2013.

Polymorphisms of the prolactin receptor gene (PRLR) and it's effect on litter size in sows; nagrada za usmenu prezentaciju na Vth International Scientific Symposium for PhD Students and Students of Agriculture Colleges 2014., Inowroclaw, Poljska

Developmental consequences of perinatally altered serotonin metabolism in rats: relationship between central and peripheral serotonin compartments; skup Autism and Related Disorders: From Bench to Bed 2014., La Ciotat, Francuska

### Projekti

Sudjelovanje na manifestaciji „Noć biologije“ 2012. i 2013.

Sudjelovanje na Smotri sveučilišta u Zagrebu 2012.

Sudjelovanje na BIUS-ovom projektu proučavanja vrsta otoka Cresa 2013.

Sudjelovanje na BIUS-ovom projektu proučavanja vrsta PP Grabovača 2014.

Sudjelovanje na BIUS-ovom projektu proučavanja vrsta mekušaca Istre 2014.

### Članstva

Volontiranje u udruzi za terapijsko jahanje „Krila“ od 2012.

Član udruge studenata biologije BIUS, sekcija za proučavanje šišmiša od 2012.